

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
KALLIKREIN AUF DIE WUNDHEILUNG:**

**^{35}S -INKORPORATION IN KÜNSTLICH ERZEUGTES
GRANULATIONSGEWEBE**

Nikolaus Demmel

1977

Aus dem Institut für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie der Universität München
Komm.-Leiter Prof. Dr. H. Fritz

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON KALLIKREIN AUF DIE WUNDHEILUNG:

³⁵S-INKORPORATION IN KÜNSTLICH ERZEUGTES GRANULATIONSGEWEBE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Nikolaus Demmel
aus Oberfischbach

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Dr. med. Engler
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Fritz
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 3. 1977



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
- II. Das Kallikrein-Kinin-System
 1. Geschichte
 2. Chemie der Kallikreine u. Kinine
 3. Aktivierung der Kallikreine
 4. Wirkung der Kallikreine
 5. Wirkung der Kinine
- III. Der Wundheilungsprozeß
 1. Vorgänge bei der Wundheilung
 2. Das Kallikrein-Kininsystem bei der Wundheilung
- IV. Experimentelle Erzeugung von Granulationsgewebe
- V. Radiochemische Untersuchung der Wundheilung
 1. ^{35}S -Einbau in Gewebe
 2. Flüssig-Szintillations-Technik
- VI. Eigene Versuche
 1. Material
 2. Versuchsablauf
- VII. Ergebnisse
- VIII. Diskussion der Ergebnisse
- IX. Zusammenfassung
- X. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Wundsetzungen im Berufsleben und besonders im heutigen Straßenverkehr haben ein Ausmaß erreicht, wie es früher nur aus Kriegszeiten bekannt war. Die damit verbundenen Probleme von Primär- und Sekundärheilung in der allgemeinen und in der plastischen Chirurgie erlangen immer größere Bedeutung.

Die Vorgänge bei der Wundheilung wurden von der Grundlagenforschung als sehr komplexe Prozesse mit vielen Regulationsmechanismen und Beeinflussungsmöglichkeiten in ihren Grundzügen aufgeklärt.

E. K. FREY beschrieb schon 1929 einen günstigen Einfluß von Padutin[®], einem Schweinepankreas-kallikreinpräparat, auf die Regenerationsvorgänge am Knochen. Kallikrein wurde seitdem immer wieder bei der Behandlung schlecht heilender Wunden und Transplantate verwendet.

Bei Versuchen mit Rattenthymuslymphozyten und Knochenmarkszellen stellten nun vor kurzem RIXON und WHITFIELD einen stimulierenden Effekt dieses Enzyms auf die Einleitung der DNA-Synthese und Zellproliferation fest.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen fördernden Einfluß von Kallikrein im Zusammenhang mit der Zellproliferation bei der Granulationsgewebsbildung und Wundheilung zu prüfen.

II. Das Kallikrein-Kinin-System

1. Geschichte der Entdeckung des Kallikreins und des Kininsystems (1)

Bereits im Jahre 1909 entdeckten ABELOUS und BARDIER im Urin eine blutdrucksenkende Substanz, die sie Urohypotensin nannten.

1925 stellte E.K. FREY bei seinen Versuchen an Hunden fest, daß nach intravenöser Hunde- oder Menschenurininjektion der mittlere Blutdruck vorübergehend abfällt.

Zusammen mit WILLSTAEDTER gelang es ihm, die hochmolekulare, thermolabile Substanz zu isolieren.

Die zuerst nach FREY benannte "F-Substanz" wurde ursprünglich für ein Hormon gehalten und der Arbeitskreis von FREY, KRAUT und WERLE forschte intensiv nach der entsprechenden Drüse. Sie fanden dabei in Extrakten von Menschen-, Schweine- und Rinderpankreas so große Mengen der blutdrucksenkenden Substanz, daß die Bauchspeicheldrüse als Ursprungs-ort angenommen wurde. Man taufte die F-Substanz nach dem griechischen Kallikreas (= Pankreas) in Kallikrein um.

WERLE entdeckte weiter, daß Kallikrein im Pankreassaft ausgeschieden wird und größtenteils als inaktive Vorstufe vorliegt, die durch Trypsin aktiviert werden kann. Er wies die Substanz außerdem in Speicheldrüsen, Nieren und Intestinum nach.

In jüngerer Zeit fand man auch in den Samendrüsen des Meerschweinchens und in Akrosomen der menschlichen Spermatozyten kallikreinähnliche Substanzen.

1936 entdeckte und isolierte WERLE eine Substanz, die durch Einwirkung von Kallikrein auf Serum entsteht und die eine vielfach höhere Kreislaufaktivität besitzt als das Kallikrein selbst; er nannte es Kallidin. Er erkannte, daß Kallikrein ein Enzym ist, das phamarkologisch wirksam wird durch die Freisetzung von Kallidin aus einem Plasmaglobulin, genannt Kallidinogen.

1949 fand ROCHA E SILVA eine weitere blutdrucksenkende Substanz, die durch Kallikrein aus dem Serum freigesetzt wird: das Nonapeptid Bradykinin.

WERLE stellte 1950 fest, daß Kallidin und Bradykinin aus demselben Substrat

im Plasma, einer α_2 -Globulinfraktion, stammen. Die Isolierung, Sequenzanalyse und Synthese beider Substanzen erfolgte 1960 - 1962.

Die durch das Kallikrein freigesetzten Substanzen werden allgemein als Kinine, ihre inaktiven Vorstufen als Kininogene und die Enzyme, die Kinin aus Kininogen freisetzen, als Kininogenasen bezeichnet. Bei Säugetieren und beim Menschen kommt die Kininogenase als Präkallikrein (Vorstufe) und als Kallikrein (freie, aktive Form) in Pankreas, Parotis, Urin und Mundspeicheldrüsen vor, im Plasma findet man das Enzym nur als Präkallikrein.

2. Chemie der Kallikreine und Kinine

Die Kallikreine gehören zur Gruppe der Polypeptid-Hydrolasen. Man unterscheidet 2 Gruppen von Kallikreinen: die Plasmakallikreine mit einem Molekulargewicht von 97.000 und die Drüsen- oder Organkallikreine mit einem wesentlich niedrigerem Molekulargewicht von knapp 30.000. Das bestuntersuchte von letzteren ist das Schweinepankreas-kallikrein mit einem Molekulargewicht von 27.000 bis 29.000 je nach Zuckergehalt (2). Der genaue Aminosäuregehalt und die Sequenz sind inzwischen bekannt (FIEDLER, EHRET, TSCHESCHKE).

Als Kinine bezeichnet man die zu den Gewebshormonen gehörenden, biologisch aktiven Polypeptide, die nicht von bestimmten Drüsen sezerniert werden, sondern ubiquitär vorkommen. Zu ihnen gehören neben den Kininen die Angiotensine und die Hormone des Gastrointestinaltraktes.

3. . Aktivierung der Kallikreine

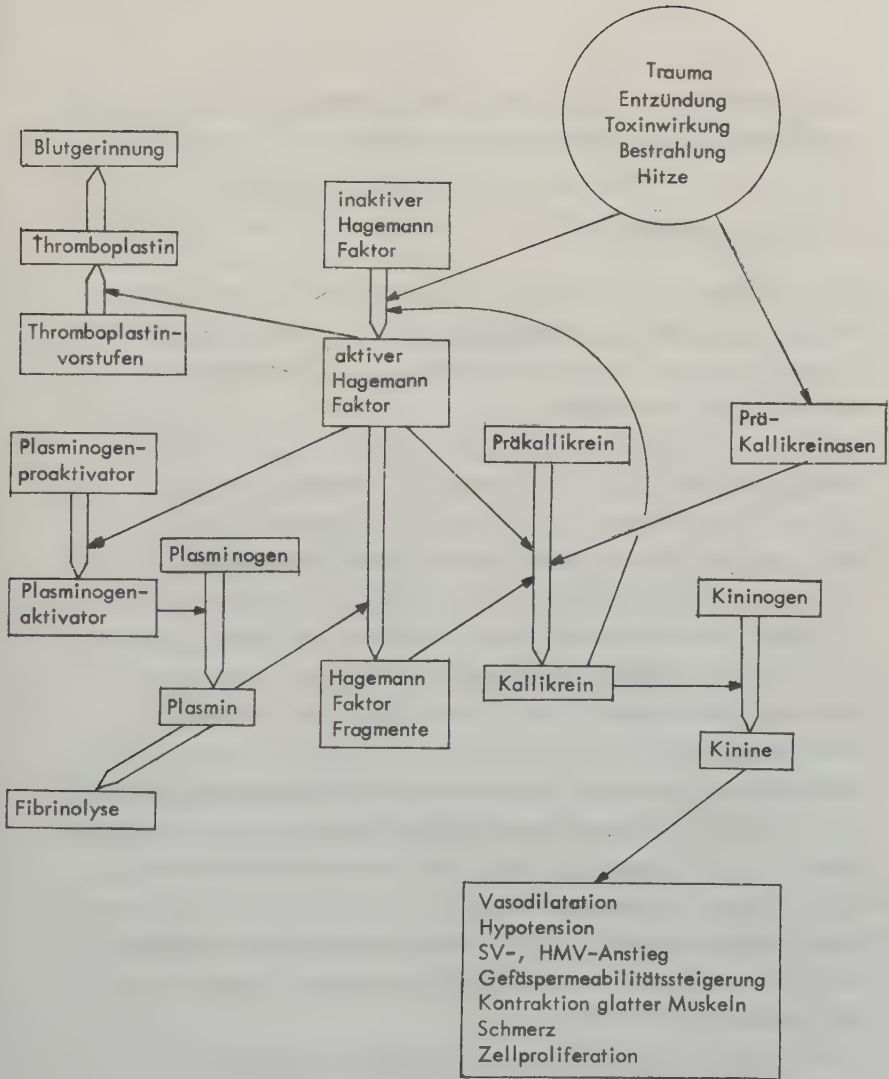
Speicheldrüsenkallikrein liegt in aktivem Zustand in Zellorganellen gespeichert vor (3). Pankreaskallikrein ist ebenfalls zusammen mit anderen Proenzymen in Zellorganellen gelagert, jedoch als inaktives Präkallikrein, das durch Trypsin aktiviert werden kann.

Die Aktivierung des Plasmakallikreins ist ein komplexer Vorgang: Traumen, Entzündungen, Toxinwirkung, Bestrahlung, Hitze, Kälte vermögen Plasma-
präkallikrein zu aktivieren. Diese Ereignisse führen unter anderem zur Umwandlung des im Blut in inaktiver Form vorliegenden Hagemann-Faktors in die aktive Form (4), die wiederum Präkallikrein in Kallikrein umwandelt. Der Hagemann-Faktor löst die Blutgerinnung und Fibrinolyse aus: Aus Plasmathromboplastinvorstufen wird aktives Thromboplastin gebildet, welches die Blutgerinnung in Gang setzt, und aus Plasminogenproaktivator entsteht Plasminogenaktivator, der aus Plasminogen Plasmin freisetzt. Plasmin seinerseits hydrolysiert außer Fibrin auch den Hagemann-Faktor in Fragmente, die wiederum aus Präkallikrein Kallikrein freisetzen und dabei noch wirksamer sind als der Hagemann-Faktor selbst (5).

4. Wirkung der Kallikreine

Allen Kallikreinen ist gemeinsam, daß sie Kininogene spalten und sich dabei durch hohe Substratspezifität auszeichnen. Sie wirken als Proteasen und setzen durch Spaltung zweier Peptidbindungen des Kininogens die pharmakologisch äußerst wirksamen Kinine frei: das Nonapeptid Bradykinin und das Dekapeptid Kallidin (6).

Die Kallikreine aus Pankreas, Speicheldrüsen und Harn spalten das Substratmolekül Kininogen unter Freisetzung von Kallidin, sie können daher als Isoenzyme bezeichnet werden. Serumkallikrein dagegen setzt aus Kininogen Bradykinin frei (7-11).



➡ = Umwandlung

→ = bewirkt

Alle Kallikreine besitzen außerdem eine esterolytische Aktivität, die vorwiegend gegen die Ester des Arginins gerichtet ist (12).

5. Wirkungen der Kinine

Die pharmakologische Wirkung der Kallikreine ist die Folge der enzymatischen Freilegung von Kininen aus ihren Vorstufen. Sie rufen deshalb in vivo qualitativ dieselben Erscheinungen hervor wie die Kinine; quantitative Unterschiede sind pharmakodynamisch zu erklären (13, 14).

Intensität und Dauer der nach Kallikreininjektion auftretenden Wirkungen resultieren aus der Hemmung der Kallikreine, der Geschwindigkeit der Kininfreisetzung und dem Kininabbau durch Kininasen.

Im Vordergrund steht die Wirkung auf den Blutkreislauf. Die Kinine bewirken eine Erweiterung von Arteriolen und Kapillaren. Es kommt zu Blutdrucksenkung und zu vermehrter Durchblutung von Haut, Muskulatur, Gehirn, Lunge und Coronargebiet.

Untersuchungen am Kaninchenohr ergaben nach Kallikreininjektion eine Dilatation von Arterien und Kapillaren (15). Beim Menschen zeigt sich die vermehrte Hautdurchblutung als Rötung von Gesicht, Hals und Brust (16) und in einem Temperaturanstieg der Fingerkuppen (17).

Bei gefährdeten, schlecht durchbluteten Hauttransplantaten wurde nach Kallikreininjektion in die Basis eine wesentliche Verbesserung der Durchblutung des Hautlappens gefunden (18, 19).

An den Gehirnhäuten wurden die Kinine als potenteste vasodilatierende Substanzen beobachtet (20).

Die Wirkung der Kinine am Gesamtkreislauf und am Herzen besteht neben einer Senkung des mittleren arteriellen Blutdruckes und des peripheren Widerstandes, in einer Steigerung der Herzfrequenz und einer Zunahme von Schlagvolumens und Herzminutenvolumen (21).

Bereits in physiologischen Konzentrationen führen die Kinine außerdem zu einer Steigerung der Kapillar- und Venenpermeabilität durch Auflockerung der Kittleisten des Gefäßendothels (20), was zu vermehrtem Austritt von Farbstoffen (22), von Plasmaproteinen (25) und zu Ödem- und Quaddelbildung (24 u.a.) führt.

Den Kininen wird daher eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen, bei der Potentierung des Schwartzmann-Phänomens sowie der Auslösung des Endotoxinschocks und dem Schock bei Pankreatitis zugeschrieben.

Auf die glatte Muskulatur von Uterus, Magen, Darm und Bronchien wirken die Kinine erregend. Sie gehören zu den an diesen Organen am stärksten kontrahierend wirkenden Substanzen (20).

Im Nervensystem stimulieren Kinine zentral parasymphatische Zentren (20), indem sie Acetylcholin freisetzen. Peripher haben sie eine nicht nikotinartige, ganglienstimulierende Wirkung.

Kommen sie mit Nociceptoren in Berührung, lösen sie Schmerz aus.

Vor kurzem wurde nun festgestellt, daß die Kinine auch Einfluß auf die Zellteilung haben (25): Bei in vitro und in vivo Versuchen mit Rattenthymuslymphoblasten und Knochenmarkszellen stellte sich heraus, daß sich nach Bradykinin- und Kallikreininjektionen signifikant mehr Zellen in DNA-Synthese- und Mitose-Phase befanden. Dabei spielt Ca^{++} eine entscheidende Rolle in der Übermittlung des mitogenen Stimulus, auch Cyclo-AMP scheint zwischengeschaltet zu sein.

Auf die Bedeutung dieser Wirkungen der Kinine für Entzündung und Gewebsregeneration wird später noch eingegangen.

III. Der Wundheilungsprozess

1. Verlauf der Wundheilung

Unmittelbar nach einer Gewebsläsion kommt eine Fülle anaboler und kataboler Prozesse in Gang, die in wechselnder Intensität, teilweise parallel laufend, für die Wiederherstellung des gestörten physikochemischen Gleichgewichts des Gewebes sorgen.

Unmittelbare Wundfolgen

In der frischen Wunde treten zunächst aus eröffneten Gefäßen und Gewebsspalten Blut, Lymphe und Interzellularflüssigkeit aus. Die über Thromboplastin-, Thrombin- und Fibrinbildung einsetzende Blutgerinnung führt zu einer ersten Abdeckung und Verklebung der Wunde.

Permeation und Exsudation von Blutbestandteilen in das Gewebe führen zum entzündlichen Ödem und werden durch Gewebsazidose und die dabei beginnenden katabolen Prozesse mit Freisetzung vasoaktiver Stoffe im Wundgebiet fortlaufend gesteigert.

Dem Austritt von Blutbestandteilen folgt die Emigration kernhaltiger Elemente: zuerst vor allem Granulozyten, dann überwiegend mononukleäre Rundzellen.

Wundheilungskatabolismus

Zu den unmittelbaren Wundsetzungsfolgen gehört die Gewebsazidose, die bereits wenige Minuten nach Gewebsläsion nachgewiesen werden kann. Ursache hierfür ist die posttraumatisch-entzündliche Gefäßirritation mit Peritase und Stase und ihren Folgen, lokalem Sauerstoffmangel bzw. CO_2 -Druckerhöhung.

Durch Steigerung des Katabolismus, Zunahme des Sauerstoffbedarfs und ver-

mindertem Sauerstoffdruck im Wundgebiet kommt es zur anaeroben Glykolyse mit Anreicherung fixer Säuren und damit zur Verstärkung der Azidose und zur Störung von Säure-Basen-Gleichgewicht, Elektrolyt- und Wasserhaushalt.

Als Mediatoren der entzündlichen Reaktionen wirken dabei neben den azidosebedingten organischen Säuren biogene Amine wie Histamin und Serotonin, Acetylcholin, Zell- und Kernabbauprodukte und vor allem die äußerst wirksamen Polypeptide Bradykinin und Kallidin. Bei der Freisetzung und Aktivierung der aktiven Substanzen spielen Plasmin, Kallikrein und andere Proteasen eine Rolle. Auch durch die primär freigesetzten Lysosomen entstehen entzündungsfördernde Mediatoren.

Im Wundgebiet gelangen so Exsudation, Gerinnung, Emigration, Azidose, Ischämie, Nekrose und Katabolismus in kurzer Zeit zu einem Höhepunkt.

Der entzündliche Bindegewebsabbau startet zunächst extrazellulär durch die schlagartige Freisetzung primärer Lysosomen (intrazelluläre Ansammlung saurer Hydrolasen).

Der Abbau der Grundsubstanz verläuft über kolloidchemische Veränderungen, Desaggregation, Teilchenzerkleinerung, Depolymerisation, Denaturierung und schließlich Spaltung durch Proteasen, Peptidasen und Glykosidasen. Entsprechend kommt es zu einer enzymatischen Auflösung der Kollagenstrukturen durch Denaturierung und Abbau durch unspezifische Proteasen.

Der Abbau gewebeeigenen und fremden Materials des Wundfeldes wird intrazellulär fortgesetzt durch Pino-, Phago- und Endozytose in Mikro- und Makrophagen.

Die entzündlichen Gefäßreaktionen Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung führen mit der Zeit zu einer zunehmenden Blut- und Sauerstoffversorgung des Wundgebietes, die Azidose normalisiert sich, die Aktivität der Enzyme mit

saurem pH-Optimum reduziert sich und Enzyme mit neutralem pH-Optimum werden aktiviert. Das führt zu einer Abnahme des Katabolismus und einer Zunahme anaboler Vorgänge.

Wundheilungsanabolismus

Dem Austritt von Plasmabestandteilen und Erythrozyten folgt die Emigration kernhaltiger Elemente.

Während der hämatogene Ursprung der Granulozyten klar ist, mußte besonders die Herkunft der Makrophagen und Fibroblasten mit modernen Methoden überprüft und abgeklärt werden.

Vor allem die in den ersten Phasen auftretenden Zellen sind im wesentlichen hämatogenen Ursprungs: der größte Teil der Makrophagen stammt von hämatogenen Monozyten bzw. von lymphomonozytären mononukleären Rundzellen, von denen auch die Histiozyten abstammen.

Bei der weiteren Transformation und Differenzierung besonders in Makrophagen und Fibroblasten ist ihre Unterscheidung von primär histiogen Zellen gleicher Struktur und Funktion (z.B. perikapillären Perizyten) schwer möglich. Auch lymphoide Elemente können multipotente Transformations- und Differenzierungsfähigkeiten in die einzelnen Zellformen des Granulationsgewebes besitzen, einschließlich Perizyten bzw. Adventitiazellen.

LINDNER (27) sieht in diesen Differenzierungen und Proliferationen Zellmodulationen, d.h. verschiedene Funktionszustände der Bindegewebszelle schlechthin.

Die für den weiteren Wundheilungsablauf wichtigsten Zellen sind die Fibroblasten. Sie entwickeln sich aus den wenigen ortsständigen Fibrozyten und aus weißen Blutzellen. Ihre Aufgabe ist die Grundsubstanz- und Kollagensynthese. Durchschnittlich 2 Tage nach Wundsetzung kommt es zu einer schnellen Fibroblastenproliferation, die Mitoserate steigt im Wundfeld bis auf das 12-fache (28).

Autoradiographische und ^{35}S -Inkorporationsmessungen zeigen, daß die Grundsubstanzsynthese bereits innerhalb der ersten 60 Minuten nach Wundsetzung gegenüber der Ausgangslage erhöht (29-31) und unmittelbar in Wundnähe am stärksten ist. Hautschnittwunden von Ratten zeigen dabei ein erstes Maximum am 4. Tag und ein zweites Maximum am 12. Tag der Wundheilung.

Die Proteoglykane werden als einheitliche Makromoleküle in den Bindegewebszellen in einem Zeitraum von 120 Minuten synthetisiert und ausgeschleust.

Die Grundsubstanzsynthese ist die Voraussetzung für die nachfolgende Fasersynthese, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen beweisen (32). Beide Vorgänge können in ein und derselben Zelle ablaufen. Es ist möglich, daß durch das Leitungsmuster der Grundsubstanz-Mucopolysaccharide der zu bildenden Kollagenfaser matrizenartig die Struktur vorgegeben und so die Faserbildung reguliert wird (33).

Der Kollagenfasergehalt bestimmt im wesentlichen Wundfestigkeit, Dehnungsstärke und Zerreißfestigkeit.

Organisation der Wunde

Parallel zur Fasersynthese beginnt am 3. bis 4. Tag die Regeneration von Blut- und Lymphgefäßen im Wundgewebe. Sie geht von erhaltengebliebenen Gefäßen des Wundrandes aus, beginnt mit morphologischen Veränderung von Endothelien und Perizyten, Aktivierung und Migration in das Wundfeld und resultiert in Sprossung, Anastomosierung und schließlich Kanalisierung der Gefäßräume.

Ab dem 6. Tag wird das Gewebe weiter differenziert. Der Wassergehalt nimmt ab, der Polymerisationsgrad der Grundsubstanz nimmt zu. Die Kollagenstrukturen bilden sich von der Polypeptidschraube zu Dreierschraubenbündeln und weiter zu Kollagenfibrillen.

Die Zahl der Fibroblasten nimmt wieder ab und auch die Durchblutung geht etwas zurück.

Das führt zu Stabilität und Konsolidierung der Narbe.

Die vollständige oder unvollständige Wiederherstellung der Ausgangssituation ist qualitativ und zeitlich abhängig von Lokalisation, Art, Grad und Einwirkungsdauer der Entzündungsursachen und vom richtigen Ineinandergreifen einer Fülle von Regulationsmechanismen. Hier spielt das Kallikrein-Kinin-System eine immer größere Rolle.

2. Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Wundheilung

Obwohl Bradykinin bei der Berührung mit Nociceptoren Schmerz erzeugt (34,35) und Kallidin und Bradykinin bei intrakutaner Applikation ebenfalls Schmerzen hervorrufen (36-38), ist ihre Identität mit den bei Gewebsläsionen und Entzündungen für die Schmerzempfindung verantwortlich gemachten "pain producing substances" nicht erwiesen.

Präkallikrein und Kallikrein stehen in enger Beziehung zu Blutgerinnung und Fibrinolyse (5, 39, 40).

Sie wirken nach WEBSTER und INNERFIELD (41) als biologische Antagonisten von Präplasmin-Plasmin, deren Aufgabe es ist, die Gewebshomöostase wiederherzustellen.

Durch die Kininfreisetzung in der katabolen entzündlichen Phase der Wundheilung kommt es zu Vasodilatation und Kapillarpermeabilitätserhöhung im Bereich der Gewebsläsion. Vermehrte Durchblutung, Exsudation und Emigration führen zum entzündlichen Ödem und später durch vermehrten Stoffaustausch zur Normalisierung der gestörten biochemischen Verhältnisse.

Eine ganz wesentliche Bedeutung könnten Kallikrein und Kinine beim Beginn der anabolen Phase der Gewebregeneration haben: die schon erwähnten Versuche von RIXON und WHITFIELD an Rattenthymuslymphozyten und Knochenmarkszellen

(25) ergaben eine deutliche stimulierende Wirkung von Bradykinin auf die DNS-Synthese und Zellproliferation, die durch Kalzium vermittelt wird. Kallikrein und Kinine könnten so ebenfalls auf die DNS-Synthese und Mitose der Bindegewebszellen aktivierend wirken: Stimulierung von Zellen, die für den Katabolismus mitverantwortlich sind und damit beschleunigte Reinigung des Wundfeldes; vor allem aber Anregung der Fibroblasten zu Proliferation, vermehrter Grundsubstanz- und Fasersynthese und damit zum beschleunigten Neuaufbau von Gewebe.

Kallikrein mußte also auf die Wundheilung und Granulationsgewebsbildung über verbesserten Stoffaustausch und zellproliferative Wirkung fördernd wirken. Das wird durch einige Versuche bereits bestätigt. Starke Radiodermatiden, verursacht durch Bestrahlung von Ratten mit Hautoberflächendosen von 70.000 r, konnten durch Kallikreinapplikation innerhalb 6 Wochen geheilt werden (42, 43). MANDEL und RODESCH stellten ebenfalls eindeutig fest, daß Kallikrein einen günstigen Effekt auf die Überlebenschance nach Bestrahlung und auf die Wundheilung nach Radiodermatitis bei lokaler Bestrahlung hat; es wirkt außerdem regenerationsfördernd auf das Knochenmark (44,45).

IV. Experimentelle Erzeugung von Granulationsgewebe

Um experimentell reines Granulationsgewebe zu gewinnen und es sowohl quantitativ als auch qualitativ in Abhängigkeit von verschiedenen Substanzen zu untersuchen, sind mehrere Methoden bekannt.

1. Erzeugung von Granulationsgewebe durch Fremdkörper: Granulomröhre nach SELYE (46), Wattepresslinge (47), intraperitoneale Injektion von Partikelchen (Staub usw.) (48), Injektion von Fibrinschaum (49).

2. Auslösung von Granulationsgewebe durch chemische Substanzen: Terpentinsabszesse (50), Granulombeutel nach SELYE (51).

3. Initiation einer Entzündung durch Senfölschemosis, (52), Rattenpfotenödeme (53 u.a.).
4. Radiodermatitiden: lokale Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (56,57).
5. Wundsetzung durch Verbrühung (56,57)
6. Methode nach RUDAS (58):

LAMM und RUDAS gewannen Granulationsgewebe, indem sie den Versuchstieren ein kreisförmiges Hautstück ausschnitten und die Wundränder zurücknähten, damit sich die Haut nicht kontrahieren konnte und die Wunde nicht durch Epithelisierung induziert wurde. Die zurückgenähte Haut wurde mehrere Tage später entfernt, das Granulationsgewebe von der Fascie abgetrennt und histologisch untersucht.

Zwecks Vereinfachung und um eine konstante Wundfläche zu erhalten, wurde die Methode von RUDAS (1960) modifiziert: er implantierte Plastikringe.

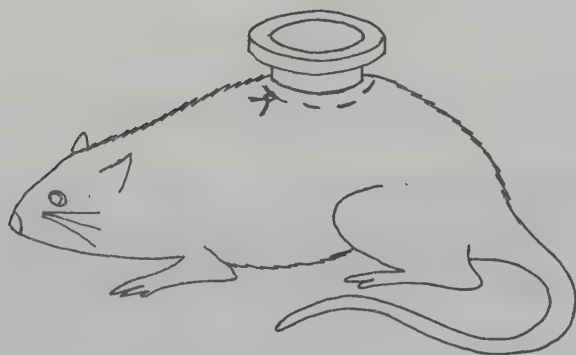
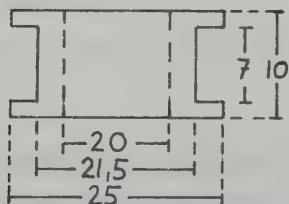
Diese verbesserte Methode von RUDAS kam in unseren Versuchen zur Anwendung.

Technik bei der verbesserten Methode nach RUDAS

Es werden Ringe aus Polyvinylchlorid verwendet. Sie gleichen einem kleinen Zylinder, dessen Ränder am oberen und unteren Rand nach außen umgebogen sind. Die Maße sind in der Skizze angegeben.

Die Versuchstiere werden narkotisiert, das Fell über dem Rücken rasiert und das freiliegende Hautstück jodiert. Die Haut wird etwas von der darunterliegenden Fascie abgehoben und, bei jedem Tier möglichst an der gleichen Stelle, ein Hautstück von etwa 1 cm Durchmesser ausgeschnitten. Der so entstandene Hautdefekt ist kleiner als die Weite des Ringes. Die Wundränder werden nun mit einer Pinzette etwas auseinandergezogen, und der Ring wird in das Loch gedrückt.

Die noch elastischen Wundränder ziehen sich über dem verbreiterten unteren Rand des Ringes zusammen und halten ihn fest. Um den Ring zusätzlich vor Herausreißen zu sichern, kann man eine Art Tabaksbeutelnaht anlegen.



Zum Schutz der Wunde vor Verunreinigung wird über den Ring luftdurchlässiges Pflaster geklebt.

Der Ring sitzt mit seiner Basis auf der Muskelfascie auf, sein äußerer Rand grenzt an die Subcutis und verhindert eine Kontraktion der Wundränder. Im Inneren des Ringes kann so eine flächenhafte Granulation entstehen.

Die Tiere müssen in Einzelkäfigen gehalten werden, da sie sich sonst gegenseitig Pflaster und Ringe zerbeißen und herausreißen und die Wunden verschmutzen. Die Nahrung ist Normalkost.

Zu dem gewünschten Termin werden die Tiere mit Äther getötet. Dann wird ein größerer Hautbezirk einschließlich Ring umschnitten und die Haut mit Subcutis und einschließlich dem Granulationsgewebe sorgfältig von der Fascie mit einem Skalpell abpräpariert. Das geht relativ leicht, da zwischen Haut und Fascie nur eine sehr lockere Verbindung besteht.

Von dem so entnommenen Hautlappen können nun mittels einer Schere oder geeigneter Stanzen Proben vom Granulationsgewebe oder von der unversehrten Haut entnommen werden.

V. Die Radiochemische Untersuchung der Wundheilung

1. ^{35}S -Einbau in Gewebe

Zur Untersuchung der Vorgänge bei der Granulationsgewebsbildung und Wundheilung und deren Abhängigkeit von verschiedenen Parametern

bieten sich mehrere Methoden an:

- a) die Bestimmung der Menge der erzeugten Granulationsgewebe durch Wiegen, z.B. bei RUDAS durch Wiegen des Ringinhalts,
- b) biochemische Untersuchung des Granulationsgewebes, z.B. Bestimmung von Eiweiß, Kollagen usw.
- c) Untersuchung der Wundheilung mit radioaktiven Substanzen,
 - α) histotopographische Untersuchung mit der Autoradiographie
 - β) quantitative Sulfatbestimmung mit $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$

Sie wird von einer großen Zahl von Autoren benutzt.

Hierzu einige theoretische Grundlagen:

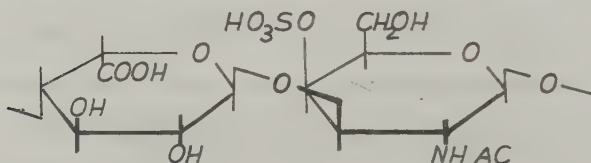
Injiziert man einem Versuchstier ^{35}S in Form von $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, so werden 95 % des Isotops in den ersten 5 Tagen durch Faeces und Urin ausgeschieden. Die restlichen 5 % verteilen sich auf die verschiedenen Organe je nach Affinität (59).

Eine für unsere Untersuchung entscheidende Beobachtung war, daß der Sulfateinbau in schnell wachsende Gewebe, d.h. bei Feten und jungen Tieren sowie im Granulationsgewebe, höher ist, als in ruhenden Geweben (60-63).

Die ^{35}S -Sulfataufnahme scheint ein vitaler Prozeß zu sein, da sie weder in gekochtem Gewebe, noch bei Vermischung des $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ mit den Reinsubstanzen (z.B. Chondroitinsulfat) eintritt (64).

In verschiedenen Arbeiten wurde nun festgestellt, daß ^{35}S fast ausschließlich in die Mucopolysaccharide (MPS) der Grundsubstanz eingebaut wird (62, 65-68). Davon kommen in der Haut nur

Chondroitinschwefelsäure B und vielleicht Chondroitin vor (69). Nur die Chondroitinschwefelsäure B ist mit einer Sulfatgruppe ausgestattet und kommt für den ^{35}S -Einbau infrage.



Da der Einbau von ^{35}S in Eiweiß minimal und außerdem davon der Anteil im Bindegewebe sehr gering ist, kann dieser Weg des ^{35}S für unsere Versuche vernachlässigt werden (70).

Für den Einbau von Sulfat in die MPS kommen 2 Mechanismen infrage:

- 1) eine enzymatische Transsulfatierung: das radioaktive Sulfat wird auf bereits vorhandene sulfathaltige Verbindungen übertragen.
- 2) Verwendung des ^{35}S -Sulfats zur Neusynthese sulfatierter Verbindungen.

Dabei wird heute aufgrund verschiedenster Untersuchungen angenommen, daß die MPS von Fibroblasten gebildet werden (70) und daß erhöhte ^{35}S -Aufnahme und MPS-Synthese mit der Fibroblastenaktivität zusammenhängen.

24 Stunden nach der Injektion wird das Maximum des Sulfateinbaues in Ch-S (66, 71, 72) und speziell in die MPS-Fraktion der Haut gesehen (73). Die Werte fallen bis zum 17. Tag nach Applikation auf die Hälfte ab. GRASEDYK (70) bestätigt dies und findet bei Versuchen mit und

ohne Dialyse, daß das Sulfat nach 24 Stunden zum größten Teil in wasserunlöslicher Form eingebaut ist.

Die biologische Halbwertszeit von Ch-S der Haut variiert stark mit dem Alter (neugeborene Ratten 2-4, einjährige 7-9 und zweijährige 10-12 Tage)(74). Während der ersten 24 Stunden wird allerdings nur ein geringer Prozentsatz des Sulfats für den natürlichen Umsatz verwendet. Dieser tritt deshalb nicht als Fehler in Erscheinung, weil die Einbauzeit für alle Proben konstant gehalten wird und keine quantitativen, sondern nur vergleichende Aussagen gemacht werden sollen.

Der überwiegende Teil des in 24 Stunden eingebauten Sulfats gibt somit die Neusynthese sulfatierter MPS wieder. Da die sulfatierten MPS in den Fibroblasten gebildet werden, ist der ^{35}S -Einbau in Granulationsgewebe also ein Maß für die Aktivität der Fibroblasten. Ferner sind die MPS fester Bestandteil der Grundsubstanz, man kann also aus der ^{35}S -Inkorporation auf die Grundsubstanzsynthese schließen.

Schließlich ist die Produktion und Ausscheidung von MPS durch Fibroblasten eine Voraussetzung für die Faserbildung (siehe oben) und damit die ^{35}S -Aufnahme ein indirektes Maß für die Fasersynthese.

Zusammenfassend kann man sagen:

Die Menge des 24 Stunden nach $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ -Applikation im Granulationsgewebe vorhandenen wasserunlöslichen, gebundenen ^{35}S -Sulfats ist ein Maß für die Fibroblastenaktivität, die Grundsubstanzbildung und die Faserproduktion und kann also als Maß für die Bindegewebsneubildung und Granulationsgewebsentstehung bei vergleichenden Studien verwendet werden.

2. Flüssig-Szintillations-Messung (75, 76)

Zur Feststellung der Zahl der Zerfälle in einer Probe (Gewebsstück, Blut, Urin usw.) bedienen sich viele Autoren im Prinzip des GEIGER-MÜLLER-Zählrohres (z.B. 59). Dabei werden die Proben nach entsprechender Aufbereitung in einem fensterlosen Methan-durchflußzähler gemessen.

Seit kurzem gibt es nun eine Methode, die, abgesehen vom technischen Aufwand, relativ einfach und elegant erscheint und dem Methandurchflußzähler gegenüber geringere Verluste und wesentlich höhere Effektivität zeigt: die Liquid-Scintillation-Counting-Methode (Flüssig-Szintillations-Messung).

Definition der Flüssig-Szintillations-Messung:

Eine Methode zum Nachweis von Radioaktivität mit Hilfe von fluoreszierenden Lösungen und einem Photomultiplier. Die Energie der Primärpartikel in der radioaktiven Probe wird dabei vom Szintillator in Licht umgewandelt, eine Photozelle reagiert darauf mit Impulsen, die von einem Meßkreis verstärkt und registriert werden.

Nachdem uns im Pharmakologischen Institut ein entsprechendes Gerät zur Mitbenutzung zur Verfügung stand, verwendeten wir diese Methode zum Nachweis des ^{35}S bei unseren Versuchen, um einige Erfahrung darüber zu gewinnen.

Der Szintillationsvorgang

Die geringen Verluste und die hohe Effektivität der Flüssig-Szintillations-Messung kommt durch den engen Kontakt zwischen der radioakti-

ven Probe und dem die radioaktive Strahlung in meß- und zählbare Signale umwandelnden Detektor zustande, was vor allem bei der Messung energiearmer β -Strahler mit geringer Reichweite wie ^{35}S wichtig ist.

Der Detektor besteht aus dem Szintillator in Verbindung mit einer Photovervielfacherzelle.

Die zu untersuchende Probe befindet sich im Meßgefäß zusammen mit einem Lösungsmittel (meist aromatische Kohlenwasserstoffe vom Benzoltyp) und dem Szintillator (eine Lösung von einem oder mehreren fluoreszierenden Stoffen: Oligophenyle, Phenylloxazol, Phenyloxadiazole).

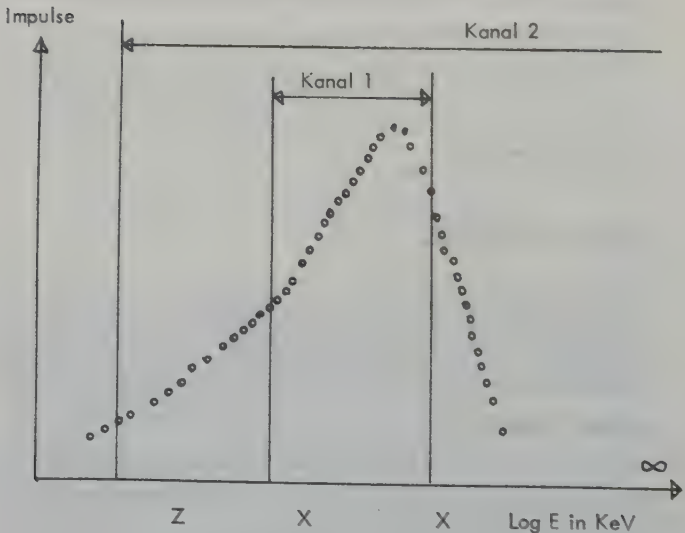
Von der radioaktiven Substanz werden nun Elektronen ausgesandt, welche die umgebenden Lösungsmittelmoleküle auf ein höheres Energieniveau heben. Diese Energie wird von einem Molekül auf das andere und schließlich auf die Szintillatormoleküle übertragen. Sie werden ebenfalls erregt und geben ihre Energie beim Zurückfallen auf ihr Ausgangsniveau als Photonen im sichtbaren oder nahen ultravioletten Bereich ab.

Der Photovervielfacher

Die im Szintillator entstandenen Lichtquanten treten durch die Wandung des Probenfläschchens, durch das Fenster des Photovervielfachers und treffen auf die Photokathode, wo sie Photoelektronen ablösen. Diese werden, durch eine Spannung von etwa 100 Volt beschleunigt, auf eine Prallelektrode (Dynode) fokussiert. Sie lösen dort je 3-5 Sekundärelektronen aus, die zu einer 2. Dynode hin

beschleunigt werden usw. bis 10-14 Stationen. Der durch diese Elektronenlawine entstandene Spannungsimpuls wird noch zusätzlich durch einen Vorverstärker und einen variablen Hauptverstärker vergrößert.

Diese Energieübertragung und -verstärkung ist ein linearer Prozeß, d.h. die Größe des resultierenden elektrischen Signals, die Impulshöhe ist proportional der Energie, die das strahlende Primärteilchen abgegeben hat. Da die Energie der vom Primärstrahler emittierten β -Strahlung ein konstantes und für jedes Isotop charakteristisches Verteilungsspektrum zeigt, werden jeweils typische Impulse registriert.



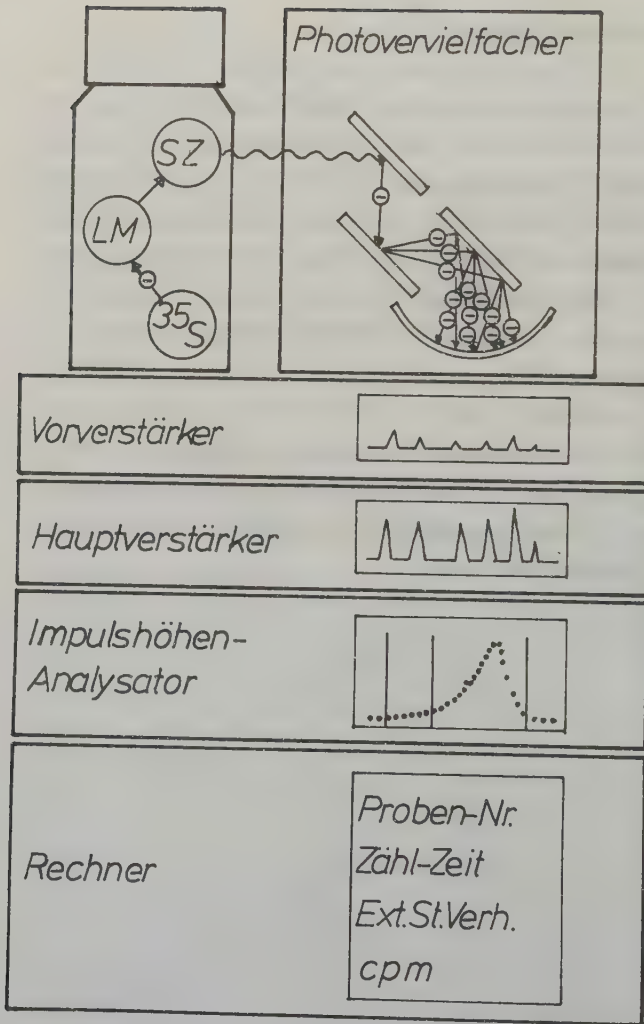
β -Spektrum

Impulshöhenanalysatoren

Von ihnen werden die eingehenden Impulse in ihrer Höhe bewertet und entsprechenden Energiebereichen des Spektrums, sog.

"Kanälen", zugeordnet. Jeder einzelne Analysator zählt dabei nur die Impulse, die in seinen Energiebereich fallen. Man kann das Spektrum in beliebig viele Energieklassen einteilen, meist werden aber nur 2-3 Kanäle verwendet. So kann man z.B. im Kanal 1 nur die Impulse von x KeV bis y KeV zählen und im Kanal 2 alle Impulse ab z KeV.

Durch diese Anordnung ist die Möglichkeit gegeben, das Gerät auf das jeweilige Isotop optimal einzustellen, zwei verschiedene Isotope mit verschiedenen Spektren gleichzeitig zu messen und den sog. Quench zu bestimmen.



Löschprozesse: "Quenching"

Bei der Energieübertragung von der Strahlenquelle auf das Lösungsmittel und vom Lösungsmittel auf den Szintillator treten Verluste auf, was zum Rückgang der Impulshöhen und Minderung der Zählausbeute führt.

- a) Konzentrationsquench: Störung der Energieübertragung vom β -Teilchen auf das Lösungsmittel und der Photonenemission bei zu großen Präparatmengen oder zu großen Szintillatormengen.
- b) Interner Quench: Verluste bei der Energieverwertung des Szintillators, wobei ein Teil der Energie in Wärme übergeht.
- c) Chemischer Quench: Substanzen, die nicht integrierter Bestandteil des Szintillators sind (Probenbestandteile) übernehmen Anregungsenergie und setzen sie in Wärme um.
- d) Färbungsquench: Energieverlust durch farbiges Material.
- e) Quench durch schlechte optische Eigenschaften des Systems: Totalreflexion am Probenfläschchen, schlechte Reflektoren im Photovervielfacher.

Der Quench kann vermindert werden durch entsprechende Probenaufbereitung und Konstruktion von Probenfläschchen und Gerät, läßt sich aber nicht ganz aufheben. Da der Quench vor allem bei biologischen Proben, wie Gewebshomogenaten, von Probe zu Probe variieren kann (die Gewebstücke haben z.B. unterschiedliche Farben), muß man bei jeder Messung die Effektivität, d.h. das Verhältnis von registrierten Impulsen zur Zahl der tatsächlichen radioaktiven Zerfälle in der Probe, bestimmen.

Dazu gibt es 3 Möglichkeiten:

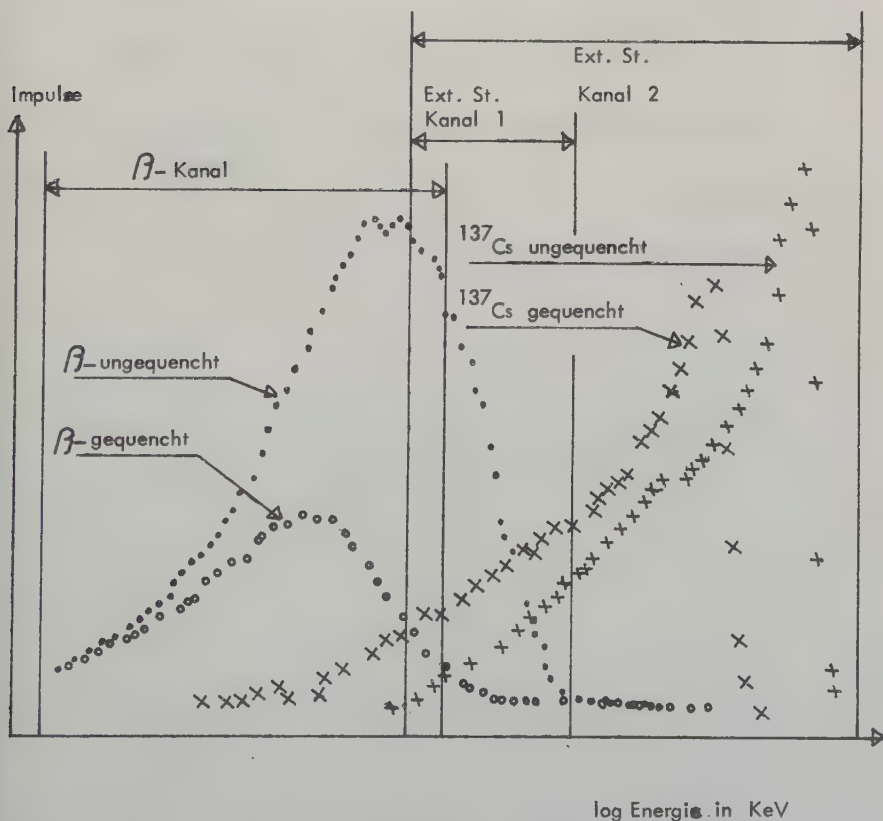
- a) Die Interne-Standard-Methode: sie ist die älteste und angeblich zuverlässigste aber auch aufwendigste und zeitraubendste. Man geht davon aus, daß ein nachträglich der gezählten Probe zugesetzter Standard bekannter Aktivität den gleichen Quenchverlust erleidet wie die Probe selbst. Die Effektivität wird aus dem Verhältnis der Zählrate des internen Standards zur tatsächlichen Aktivität des Standards berechnet.
- b) Die Kanalverhältnismethode: sie ist weniger aufwendig und einfacher. Der Quench verursacht eine charakteristische Veränderung im Spektrum des Isotops. Das läßt sich feststellen durch Änderung der Zählraten in 2 im Spektrum geeignet platzierten Kanälen. Das Verhältnis der beiden Kanäle kann dann bezogen werden auf die Effektivität. Dazu ist allerdings eine Eichkurve notwendig, die man durch Messung einer Reihe von Proben bekannter Aktivität und verschiedenem Quench aufstellt.
- c) Die Externe-Standard-Methode: sie ist für β -Strahler im biologischen Bereich (^{35}S -markierte Gewebe) genau, zerstört keine Proben und ist bei Verwendung einer Automatik einfach und schnell; sie wurde bei allen unseren Versuchen angewandt.

Bei dieser Methode kommt ebenfalls das Prinzip der Spektrumveränderung zur Anwendung:

Nachdem die Zählrate der Probe registriert ist, wird eine externe γ -Quelle (^{137}Cs , ^{226}Ra , ^{133}Ba u.ä.) in die Nähe der Probe gebracht. Der γ -Strahler erzeugt im Szintillator Elektronen mit einem Spektrum, das dem eines β -Isotops ähnlich ist. Der Quench ändert auch dieses Spektrum in charakteristischer Weise, was wieder

durch Veränderung des Verhältnisses der Zählraten in den entsprechenden Kanälen registriert wird (siehe Schema).

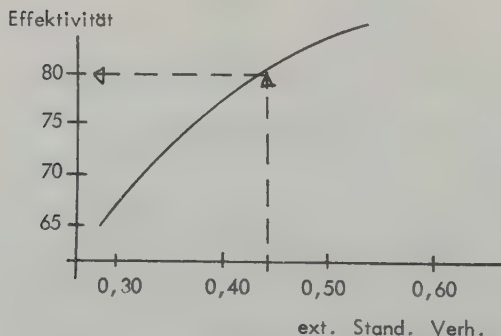
Das Gerät druckt neben der in den einzelnen Kanälen registrierten Zahl der Impulse pro Minute das von der Elektronik berechnete Kanalverhältnis für jede einzelne Probe aus.



Gequenchte und ungequenchte Spektren eines β -Strahlers und einer γ -Quelle ^{137}Cs (Externer Standard)

Wie bei der Kanalverhältnismethode wird eine Eichkurve aufgestellt. Eine Reihe von Proben mit bekannter Aktivität und aufsteigendem Quench wird gemessen. Aus dem Verhältnis der Zählraten zur tatsächlichen Aktivität wird die unterschiedliche Effektivität der einzelnen Proben berechnet und in einer Kurve gegen das Kanalverhältnis der jeweiligen Proben aufgetragen. Daran kann dann für jede Probe mit unbekanntem Quench aus dem externen Standard-Verhältnis die Effektivität abgelesen werden.

Beispiel einer Quenchkurve:



Beispiel zur Umrechnung von Impulsen pro Minute auf Zerfälle pro Minute:

Das Meßgerät hat bei einer Probe 10.000 I/min und ein externes Standard-Verhältnis von 0,45 ermittelt. Das ergibt auf der Kurve eine Effektivität von 80 % und damit

$$\frac{10.000}{0,80} = 12.500 \text{ Zerfälle pro Minute in der Probe.}$$

Die so erhaltene Zahl der Zerfälle pro Minute in der Probe ist proportional der Menge des in der Probe eingebauten Sulfats und damit ein Maß für die Bindegewebsneubildung und Granulationsgewerbsentstehung.

VI. Eigene Versuche, Material und Methode

1. Material

a) Tiermaterial

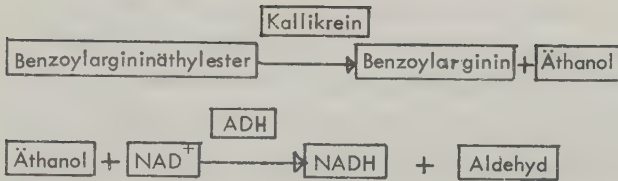
Bei allen Versuchen wurden 150 ± 5 g schwere Sprague-Dawley-Ratten vom gleichen Stamm verwendet. Die Tiere wurden mehrere Tage vor Versuchsbeginn zur Gewöhnung an die neue Umgebung in Sammelkäfigen in den Versuchsraum gebracht. Sie erhielten Altromin-Standard-Futter und Wasser ad libi dum.

b) Kallikrein

Wir benutzten gereinigtes Kallikrein aus Schweinepankreas der Firma BAYER, das in Pulverform geliefert wird und von dem wir jeweils eine für 2-3 Tage reichende Menge frisch in phys. Kochsalz lösten.

Bei Versuch 5 wurde zusätzlich Kallikrein in Rattenurin verwendet. Dazu wurde von mehreren Ratten eine entsprechende Menge Sammelurin gewonnen und in Cellophanschläuchen gegen Aqua bi dest unter Rühren und mehrmaligem Wechseln des Wassers 1 Tag lang dialysiert. Die Kallikreinkonzentration wurde nach der BAEE-Methode (nach TRAUTSCHOLD und WERLE (77)) spektrophotometrisch bestimmt.

Bei dieser Methode wird die Spaltungsgeschwindigkeit von N-Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE) durch Kallikrein nach folgenden Reaktionsgleichungen gemessen.



Die Extinktionsänderung im Photometer durch den NAD^+ -Umsatz wird während 10 Minuten bei einer Wellenlänge von 366 nm und 25°C bestimmt. Es werden 2 Messungen durchgeführt:

1. $\Delta E_0 / 10 \text{ min} = \text{Leerwert}$,
da hier die Kallikreinaktivität durch Trasylol[®] gehemmt wurde, um Beeinflussungen der Äthanolfreisetzung durch andere Faktoren zu erfassen und die Genauigkeit zu erhöhen.
2. $\Delta E_M / 10 \text{ min} = \text{Meßwert}$,
ohne Hemmung der Kallikreinaktivität.

Zur Berechnung diene folgende Formel:

$$\begin{array}{l}
 \text{Aktivität} \\
 \text{im Harn} = (\Delta E_M - \Delta E_0 \cdot 1,01) \cdot 4606,06 \quad \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]
 \end{array}$$

(Die Konstanten 1,01 und 4606,06 ergeben sich aus Verdünnung, Proben-
volumen, Schichtlänge der Küvetten und Extinktionskoeffizient).

Aus einer Dreifachbestimmung ergab sich ein Mittelwert von 855 mU/ml, entsprechend 8,55 KE/ml im Dialysat ($100 \text{ mU} \hat{=} 1 \text{ KE}$, nach (78)). Der Urin wurde lyophilisiert und anschließend mit soviel physiol. Kochsalz aufgelöst, daß eine dem gereinigten Kallikreinpräparat entsprechende Konzentration entstand.

Dosierung der Kallikrein- bzw. Urinlösung

Die Versuche von RIXON und WHITFIELD mit Thymuslymphozyten und Knochenmarkszellen (25) zeigen, daß durch Gaben von 1-10 KE Kallikrein pro 100 g Körpergewicht bereits bei 1 KE die Mitoserate deutlich ansteigt und bei 5 KE ein Maximum erreicht, das nach höheren Gaben von ungereinigtem Kallikrein bleibt und bei höheren Konzentrationen von gereinigtem Kallikrein sogar wieder abnimmt.

MANDEL und RODESCH gaben bei Wundheilungs- und Überlebensversuchen nach Röntgenbestrahlung an Ratten ebenfalls 5 KE/100 g Tier (79). Deshalb verdünnten auch wir die Kallikrein- bzw. Urinlösungen so, daß sich eine Dosis von 5 KE/100 g KG, d.h. 7,5 KE/Ratte ergab.

Kontrolle der Kallikreinaktivität

Um einen etwaigen Aktivitätsverlust des in Lösung befindlichen Kallikreins zu erkennen, wurde die Konzentration der verwendeten Lösung in einer Mehrfachbestimmung mit der BAEE-Methode 16 Tage nach dem Ansetzen der Lösung kontrolliert. Das ergab einen Abfall von 7,5 KE/0,1 ml auf 6,5 KE/0,1 ml, den man aber, da die Kallikreinlösung alle 2-3 Tage frisch bereitet wurde, vernachlässigen konnte.

c) Radioaktives Natriumsulfat

^{35}S hat eine Halbwertszeit von 87 Tagen, ist ein β -Strahler mit geringer Reichweite (maximal 0,3 mm in Wasser), maximaler Energie von 0,17, durchschnittlich 0,055 MeV und daher für Laborversuche sehr gut geeignet. Der Abfall der Aktivität von 10 % in 14 Tagen spielt bei unseren Versuchen keine Rolle, da keine quantitativen, sondern nur vergleichende Aussagen gemacht werden sollten.

Es wurde für je 2 Versuchsreihen, die parallel liefen, 1 ml wässrige $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ -Lösung mit einer Aktivität von 25 mC./ml der Firma NEW ENGLAND NUCLEAR verbraucht. Die 25 mC $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ wurden mit physiol. Na Cl auf 60 ml verdünnt. Davon wurden pro Ratte 1 ml intraperitoneal gespritzt. Jede Ratte erhielt also, mit Berücksichtigung des Aktivitätsabfalles, etwa $540 \mu\text{C } ^{35}\text{S}$.

d) Szintillator-Lösungsmittelgemisch: INSTAGEL

INSTA-GEL ist eine vorgefertigte, ausgewogen zusammengesetzte Mischung von Lösungsmitteln, Szintillatoren und oberflächenaktiven Substanzen der Firma PACKARD. Es ist ein universelles Szintillations-System, kann sowohl für wässrige wie auch für nicht wässrige Proben verwendet werden und erzielt auch bei heterogenen Proben hohe Effektivität, eignet sich also gut für die Messung von Gewebeproben.

e) Lösungsvermittler: SOLUENE

Viele biologische Proben sind nicht direkt in den auf aromatischen Kohlenwasserstoffen basierenden Szintillator-Lösungsmittel-Gemischen löslich. Die Proben bestehen aus einem Gemisch von verschiedenen Makromolekülen und hydro- und lipophilen Gruppen, einigen Salzen und viel Wasser. Um bei niederenergetischen Strahlern wie ^{35}S ein homogenes System für reproduzierbare, effektive Messungen zu erhalten, braucht man spezielle Lösungsvermittler.

Als solchen verwendeten wir SOLUENE 350 der Firma PACKARD, ein quaternäres Ammoniumhydroxyd, das als starke organische Base auch größere Mengen von Proben wie ganzen Gewebstücken, Proteingemischen u.ä. in Lösung bringt und sich durch hohe Wasserbindungskapazität auszeichnet.

2. Versuchsablauf

a) Wundsetzung

Die Tiere wurden mit 1 ml/100 g Körpergewicht 3,6 %-igem Chloralhydrat, intraperitoneal injiziert, anästhesiert. Den betäubten Ratten wurde, nachdem der Rücken sauber rasiert worden war, der PVC-Ring in der angegebenen Weise implantiert, mit einer Tabaksbeutelnaht gesichert und mit luftdurchlässigem Pflaster abgedeckt.

b) Kallikreingabe

Unmittelbar nach der Operation wurde den Tieren der Testgruppe mit einer Tuberkulinspritze je 0,1 ml der Kallikreinlösung (also 7,5 KE) intramuskulär verabreicht.

Die Ratten der Kontrollgruppe erhielten 0,1 ml physiolog. Na Cl.

Bei Versuch 5 erhielt eine zusätzliche Gruppe jeweils 0,1 ml Rattenurin (ebenfalls mit 7,5 KE).

Die Injektionen wurden immer zur gleichen Tageszeit bei

Versuch 1: 3 Tage

Versuch 2: 5 Tage

Versuch 3: 7 Tage

Versuch 4: 9 Tage und

Versuch 5: 15 Tage fortgeführt.

Während des ganzen Versuchsablaufs wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten und erhielten Standardfutter und Wasser ad libidum.

c) ^{35}S -Gabe

Wegen der Bestimmungen im Strahlenschutzgesetz mußten dieser Teil der Versuche und die Probenentnahme in den strahlensicheren Räumen des Pharmakologischen Institutes durchgeführt werden.

Unmittelbar nach der letzten Kallikreininjektion, also 3, 5, 7, 9 bzw. 15 Tage nach der Operation, erhielten die Tiere je 1 ml (entsprechend etwa 540 μC) der $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ -Verdünnung intraperitoneal. Dabei wurde von Tier zu Tier ein Abstand von 10 Minuten eingehalten, um beim Töten der Tiere und der Probenentnahme Zeit zu haben und den 24 Stunden-Abstand genau einhalten zu können.

d) Töten der Tiere und Probenentnahme

Genau 24 Stunden nach der ^{35}S -Injektion wurden die Tiere im Abstand von 10 Minuten mit Äther getötet.

Der Hautlappen einschließlich Ring und Granulationsgewebe wurden in der beschriebenen Weise abpräpariert.

Da ein Zuschneiden der radioaktiven Gewebsstücke auf genau 100 mg nicht möglich ist, verwendeten wir zur Probenentnahme a) größere Stanzen, die genau in den PVC-Ring passen und mit denen das gesamte Granulationsgewebe ausgeschnitten wurde, und b) kleinere Stanzen, die aus dem Gewebe ein etwa 100 mg schweres Stück stanzen.

Bei den Versuchen 1, 2 und 5 wurde zunächst der gesamte Inhalt des Ringes ausgestanzt und gewogen. Anschließend wurde davon mit der kleinen Stanze ein Stück aus der Mitte des Granulationsgewebes gewonnen.

Zusätzlich wurde bei allen Versuchen ein Stück Normalhaut von einem von der Wunde mindestens 2 cm entfernten Bezirk ausgestanzt.

Damit die gut durchfeuchteten Granulationsgewebstücke keinen Gewichtsverlust durch Verdunsten von Wasser erlitten, kamen sie sofort in Plastikgefäße, die gut verschlossen wurden. Mit einer Analysenwaage wurden sie auf 0,1 mg genau gewogen.

e) Dialyse

Sie mußte durchgeführt werden, um nichteingebautes Sulfat auszuwaschen. Die Proben wurden einzeln mit je 3 ml 0,01 m $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung in spezielle Dialysierschläuche gebunden, von denen jeweils 10 Stück in einen Eimer mit einem Rührer und 10 l Austauschflüssigkeit gehängt wurden. Diese bestand einmal über Nacht aus fließendem Wasser, zweimal für je 2 Stunden aus 0,01 m $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dann über Nacht und anschließend noch einmal für 3 Stunden aus 0,01 m KCl-Lösung.

Nach Beendigung der Dialyse wurden die Schläuche an einem Ende aufgeschnitten und der Inhalt (Gewebe und Dialysierflüssigkeit) möglichst exakt in das Meßgläschen übergeführt. Dieser Schritt gestaltete sich schwierig und zeitraubend, da man genau darauf achten mußte, daß trotz der engen Gläschenöffnung und obwohl sich die Gewebstücke oft nur schwer ausdrücken ließen, nichts von der Probe zurückblieb oder verlorgenging und die Außenseite der Gläschen nicht mit radioaktivem Material kontaminiert wurde.

f) Trocknung

Bei den Versuchen 3 und 4 wurde der Gläscheninhalt solange im Wärmeschrank bei 60° getrocknet, bis das Dialysierwasser verdampft war.

Bei den Versuchen 1, 2 und 5 wurden die Proben vollständig getrocknet (etwa 3 Tage) und zusätzlich das Trockengewicht mit der Analysenwaage bestimmt, um so irgendwelche Verluste, die bis zu diesem Schritt aufgetreten sein konnten (u.a. bei der Überführung der Proben aus den Dialyserschläuchen in die Meßgefäße), zu eliminieren.

g) Lösen der Gewebstücke (nach der Beschreibung zu SOLUENE 350)

Die nicht vollständig getrockneten Proben bei den Versuchen 3 und 4 wurden in 1,5 ml SOLUENE /100 mg Gewebe gelöst.

Den getrockneten Proben wurde zunächst zur Verbesserung des Lösungsvorgangs je 0,3 ml Aqua dest. zugesetzt. Anschließend wurden die wieder angefeuchteten Gewebstücke in je 1,0 ml SOLUENE gelöst.

Zur Verbesserung und Beschleunigung der SOLUENE-Wirkung wurden alle Proben für etwa 3 Stunden bei 50°C gehalten.

h) Szintillator

Nachdem das Gewebe vollständig gelöst war, pipettierten wir zu jeder Probe 15 ml der Szintillatordlösung. Die Gläschen wurden fest verschlossen und zur Vermischung des Inhalts nur ganz vorsichtig geschwenkt, um jegliches Auslaufen von radioaktiver Flüssigkeit zu vermeiden. Dies hätte nämlich zu einer unkontrollierbaren Verschmutzung von Gläschen und Meßgerät und zu einer Beeinflussung des Ergebnisses (und aller folgenden Messungen) zur Folge gehabt.

i) Messung der Proben

Die Proben wurden mit dem vollautomatischen Szintillationsmeßgerät PACKARD TRI CARB Model 3385 des Pharmakologischen Institutes gemessen.

Der Computer drückte dabei das Ergebnis als Zähler pro Minute (cpm) zusammen mit Probennummer, Zähldauer und Externem-Standard-Verhältnis aus.

k) Quenchkurve

Zur Bestimmung der Effektivität der einzelnen Messungen aus dem Externen-Standard-Verhältnis mußte eine Eichkurve aufgestellt werden.

Es mußte berücksichtigt werden, daß die markierten Gewebsstücke nicht alle gleiche Größe und Gewicht hatten und auch Unterschiede in der Farbe zeigten.

Wir entnahmen daher einer Ratte, die genauso wie die anderen Versuchstiere behandelt worden war, aber kein ^{35}S erhalten hatte, mehrere Stücke von Granulationsgewebe und Normalhaut verschiedener Größe. Wir dialysierten, trockneten und wogen sie wie die anderen Proben. Schließlich wurden diese so in SOLUENE gelöst, daß wir insgesamt 24 Proben mit unterschiedlichen Gewebsmengen, SOLUENE-Konzentrationen und Farbtintensitäten erhielten.

Vom Szintillator bereiteten wir einen Pool von 375 ml, dem wir $0,8075 \mu\text{Ci}$ aus der ^{35}S -Verdünnung zusetzten. Aus diesem INSTAGEL-Aktivität-Pool pipettierten wir in 25 Probengläschen (eines ohne Gewebe) je 15 ml, so daß

jede Probe 0,0323 μC enthielt.

1 μC entsprechen $2,22 \cdot 10^6$ Zerfälle pro Minute (dpm), dh. die Aktivität in jedem Gläschen betrug 57.360 dpm.

Die Proben wurden gemessen und aus den gezählten Impulsen im Verhältnis zu den 57.360 Zerfällen für jede Probe die Effektivität berechnet.

In einer Kurve wurde das ausgedrückte Externe-Standard-Verhältnis der verschiedenen Proben gegen die entsprechende Effektivität aufgetragen.

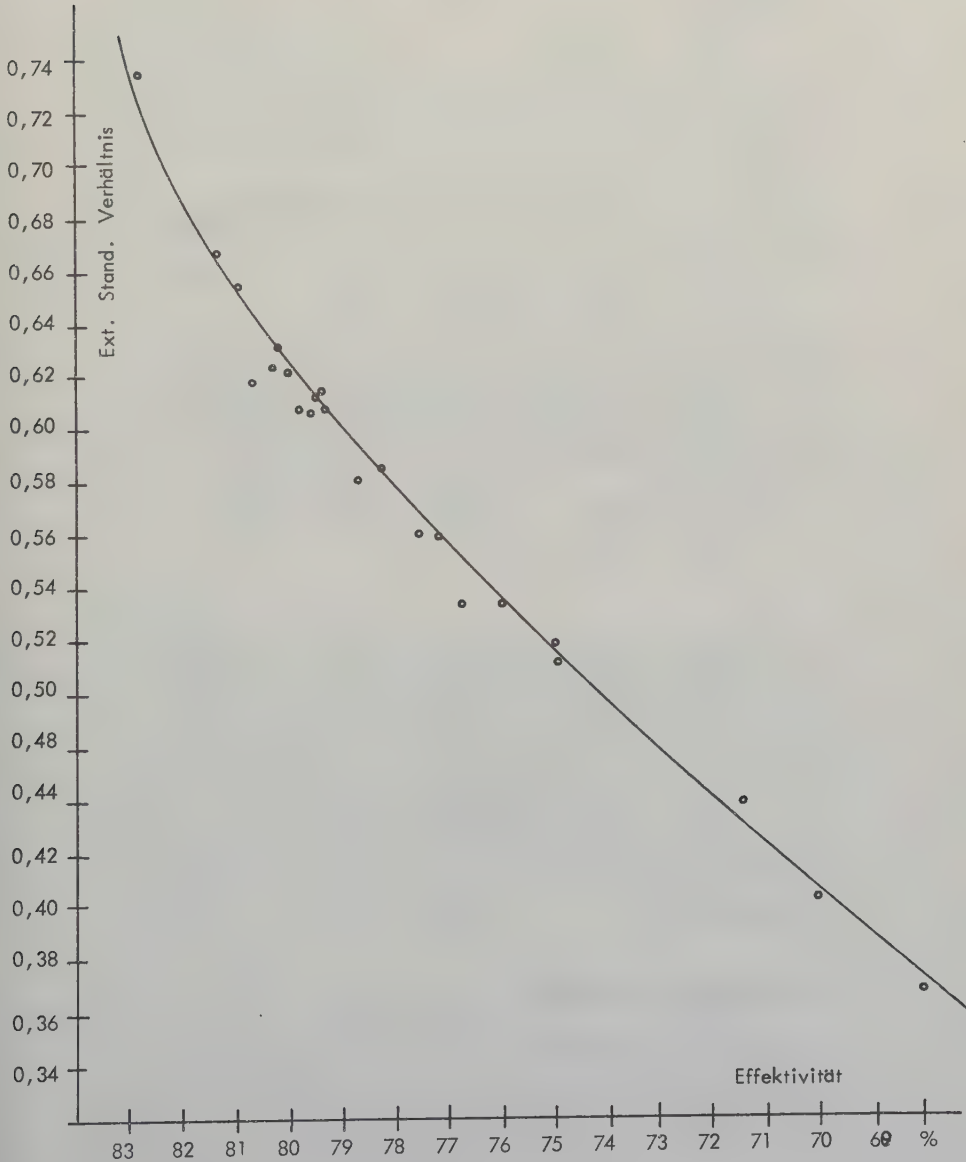
Beispiel: Probe 1 erzeugte 47.578 cpm bei einem Externen-Standard-Verhältnis von 0,735.

Das ergibt eine Effektivität von $\frac{47578}{57360} = 0,829$ oder 82,9 %.

Quenchkurve

Externer Standard

Packard Tri-Carb



l) Umrechnung

Die vom Gerät ermittelten cpm wurden unter Berücksichtigung von Externem-Standard-Verhältnis, Quenchkurve und Probengewicht auf dpm/100 mg Gewebe umgerechnet. Bei den Versuchen 1, 2 und 5 erhielten wir so das Ergebnis als dpm/100 mg Feuchtgewebe und dpm/100 mg Trockengewebe, bei Versuch 3 und 4 nur als dpm/100mg Feuchtgewebe.

Beispiel: Probe Nr. 5 bei Versuch 1 hatte 18.708 dpm, ein Externes-Standard-Verhältnis von 0,623 und ein Feuchtgewicht von 87,1 mg.

Das Externe-Standard-Verhältnis entspricht nach der Quenchkurve einer Effektivität von 80,1 %. Das ergibt eine ^{35}S -Aktivität von

$$\frac{18.708 \cdot 100 \cdot 100}{80,1 \cdot 87,1} \quad \text{dpm/100 mg} = 26815 \text{ dpm/100 mg.}$$

Außerdem wurde die "Aktivität der Wunde" festgestellt, d.h. die Relation des ^{35}S -Einbaus in der Wunde zum ^{35}S -Einbau in die normale Haut. Dazu die in die unverletzte Haut eingebaute Aktivität gleich 100 % gesetzt und danach jeweils der Prozentsatz der in der Wunde mehr eingebauten Aktivität errechnet. So kann man den unterschiedlich ausgeprägten Aktivitätsverlust des ^{35}S von der Abfüllung in der Firma bis zum Meßtermin eliminieren und den Sulfateinbau an den verschiedenen Tagen der Wundheilung vergleichen.

m) Mathematische Auswertung

Aus den Einzelwerten dpm/100 mg und mg Granulationsgewebe wurden Mittelwert, Standardabweichung und t-Wert im Students-Test errechnet. Das Signifikanzniveau mit $d=0,05$ festgelegt.

VII. Ergebnisse

Versuch 1

3 Tage je 5 KE / 100 g KG

dpm/100mg Feuchtgewebe

Normalhaut	Kontr.	38.438 $\pm$ 12.636	(n= 9)
	Kalli.	25.527 $\pm$ 7.502	(n=10)
		0,0125 α $\geq$ 0,005	
Granulationsgew.	Kontr.	50.373 $\pm$ 13.348	(n= 9)
	Kalli.	54.073 $\pm$ 12.916	(n=10)
		α $\geq$ 0,25	
Aktivität Wunde	Kontr.	131 %	
	Kalli.	141 %	

dpm/100mg Trockengewebe

Normalhaut	Kontr.	124.035 $\pm$ 44.143	(n= 9)
	Kalli.	84.280 $\pm$ 12.916	(n=10)
		0,0125 α $\geq$ 0,01	
Granulationsgew.	Kontr.	345.379 $\pm$ 44.143	(n= 9)
	Kalli.	316.533 $\pm$ 22.823	(n=10)
		α $\geq$ 0,25	
Aktivität Wunde	Kontr.	278 %	
	Kalli.	255 %	
mg Gesamtgewicht	Kontr.	423 $\pm$ 99	(n= 9)
	Kalli.	486 $\pm$ 113	(n=10)
		α $\geq$ 0,25	

Nach 3 Tagen Kallikreingabe ergibt sich bei der unverletzten Haut sowohl beim Feucht- wie beim Trockengewebe eine signifikante ($0,025 > \alpha > 0,01$) Verminderung des ^{35}S -Einbaus unter Kallikrein-einfluß.

Im Granulationsgewebe kann dagegen praktisch kein Unterschied festgestellt werden ($\alpha > 0,25$).

Die Aktivität der Wunde ist ebenfalls nicht wesentlich verändert.

Das Gesamtgewicht des gebildeten Granulationsgewebes erscheint bei der Kallikreingruppe geringfügig aber nicht signifikant erhöht ($\alpha > 0,10$).

Versuch 2

5 Tage je 5 KE / 100 g KG

dpm/100mg Feuchtgewebe

Normalhaut	Kontr.	23.567 $\pm$ 5.359	(n= 9)
	Kalli.	28.358 $\pm$ 6.582	(n= 9)
		$\alpha > 0,05$	
Granulationsgew.	Kontr.	55.013 $\pm$ 15.851	(n=10)
	Kalli.	57.875 $\pm$ 13.079	(n=10)
		$\alpha > 0,25$	
Aktivität Wunde	Kontr.	233 %	
	Kalli.	246 %	

dpm/100g Trockengewebe

Normalhaut	Kontr.	94.602 $\pm$ 34.487	(n= 9)
	Kalli.	107.903 $\pm$ 29.636	(n= 9)
		$\alpha > 0,10$	
Granulationsgew.	Kontr.	402.093 $\pm$ 103.692	(n=10)
	Kalli.	474.281 $\pm$ 192.557	(n=10)
		$\alpha > 0,10$	
Aktivität Wunde	Kontr.	425 %	
	Kalli.	501 %	
mg Gesamtgewicht	Kontr.	635 $\pm$ 200	
	Kalli.	603 $\pm$ 140	
		$\alpha > 0,25$	

Nach 5 Tagen Kallikreinapplikation ist der Sulfateinbau sowohl in der Normalhaut als auch im Granulationsgewebe unter Kallikreineinfluß geringfügig aber nicht im 5 %-Bereich signifikant verstärkt ($0,25 > \alpha > 0,05$).

Die Aktivität der Wunde erscheint daher ebenfalls nur leicht erhöht.

Das Gewicht des Granulationsgewebes dagegen ist etwas vermindert ($\alpha > 0,25$).

Insgesamt ist, abgesehen von der Normalhaut, gegenüber der 3 Tage alten Wunde ein vermehrter Einbau von Sulfat in das Granulationsgewebe, eine verstärkte Aktivität der Wunde und eine Gewichtszunahme festzustellen.

Versuch 3

7 Tage je 5 KE / 100 g KG

dpm/100mg Feuchtgewebe

Normalhaut	Kontr.	22.447 ± 2.362	(n= 9)
	Kalli.	22.703 ± 4.805	(n= 9)
		$\alpha > 0,45$	

Granulationsgew.	Kontr.	57.712 ± 17.733	(n= 9)
	Kalli.	78.088 ± 28.147	(n= 9)
		$0,05 > \alpha > 0,025$	

Aktivität Wunde	Kontr.	268 %
	Kalli.	341 %

dpm/100mg Trockengewebe

hier nicht gemessen

mg Gesamtgewicht

Nach 7-tägiger Kallikreininjektion ist der ^{35}S -Einbau in die unverletzte Haut weiter unverändert.

Die Sulfataufnahme in das Granulationsgewebe ist jedoch bei der Kallikrein-
gruppe signifikant ($0,05 > \alpha > 0,025$) erhöht.

Dem entsprechend steigert sich auch die Aktivität der Wunde von 268 % der Kontrollgruppe auf 341 % der Kallikreingruppe.

Gegenüber der 3 und 5 Tage alten Wunde hat sich der Sulfateinbau in die Normalhaut nicht verändert, er ist jedoch beim Granulationsgewebe sowohl bei den Kallikreintieren als auch, wenn auch geringer, bei der Kontrollgruppe weiter angestiegen.

Versuch 4

9 Tage je 5 KE / 100 g KG

dpm/100mg Feuchtgewebe

Normalhaut	Kontr.	27.385 ± 7.566	(n= 9)
	Kalli.	31.374 ± 11.541	(n= 9)
		$\alpha > 0,20$	

Granulationsgew.	Kontr.	70.105 ± 13.720	(n= 7)
	Kalli.	102.103 ± 38.328	(n= 9)
		$0,05 > \alpha > 0,025$	

Aktivität Wunde	Kontr.	225 %
	Kalli.	346 %

dpm/100mg Trockengewebe

hier nicht gemessen

mg Gesamtgewicht

Nach 9 Tagen Versuchsdauer bestätigt sich die nach 7 Tagen erkennbare Wirkung: während bei der Normalhaut kein Einfluß feststellbar ist, wird in das Granulationsgewebe unter Kallikreinwirkung signifikant
(0,05 > α > 0,025) mehr ³⁵S eingebaut.

Die Aktivität der Wunde steigert sich von 225 % bei der Kontrollgruppe auf 346 % bei der Kallikreingruppe.

Gegenüber den Vortagen ist bei der Normalhaut weiter keine Änderung feststellbar, der Sulfateinbau in das Granulationsgewebe nimmt aber, u.a. bei den Kallikreintieren, stark zu.

Versuch 5

15 Tage je 5 KE / 100 g KG

dpm/100 mg Feuchtgewebe

Normalhaut	Kontr.	34.073 ± 7.058	(n=10)
	Kalli.	33.924 ± 8.433	(n=10)
	Urin	32.099 ± 5.190	(n=10)
		$\alpha > 0,40$ $\alpha > 0,25$	

Granulationsgew.	Kontr.	115.846 ± 12.809	(n=10)
	Kalli.	107.009 ± 42.998	(n=10)
	Urin	113.736 ± 25.249	(n=10)
		$\alpha > 0,25$ $\alpha > 0,40$	

Aktivität Wunde	Kontr.	340 %
	Kalli.	314 %
	Urin	334 %

dpm/100 mg Trockengewebe

Normalhaut	Kontr.	142.162 ± 33.286	(n=10)
	Kalli.	138.875 ± 21.305	(n=10)
	Urin	138.000 ± 18.185	(n=10)
		$\alpha > 0,35$ $\alpha > 0,40$	

Granulationsgew.	Kontr.	1.381.875 ± 311.877	(n=10)
	Kalli.	1.434.887 ± 410.885	(n=10)
	Urin	1.258.162 ± 307.603	(n=10)
		$\alpha > 0,20$ $\alpha > 0,35$	

Aktivität Wunde	Kontr.	972 %
	Kalli.	1009 %
	Urin	885 %

mg Gesamtgewicht	Kontr.	643	± 102	(n = 2)
	Kalli.	929	± 171	(n = 3)
	Urin	850	± 148	(n = 4)
			$\alpha > 0,05$	
			$\alpha > 0,10$	

Nach 15-tägigem Versuchsablauf ist sowohl bei Gabe von gereinigtem Pankreaskallikrein als auch bei Injektion von Rattenurin kein verwertbarer Unterschied in der Aufnahme von ^{35}S gegenüber der Kontrollgruppe feststellbar.

Lediglich das Gesamtgewicht des gebildeten Granulationsgewebes ist nach Kallikrein bzw. Urinverabreichung leicht erhöht. ($0,10 > \alpha > 0,05$). Wegen der geringen Anzahl der verwertbaren Gewebsstücke kann dieses Ergebnis aber nur gering bewertet werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

(siehe dazu Graphik)

1. unverletzte Haut:

Hier ergaben sich sowohl bei den unbehandelten wie bei den behandelten Gruppen ziemlich konstante Werte von etwa 25.000 dpm/100 mg Feuchtgewebe bzw. 100.000 - 140.000 dpm/100 mg Trockengewebe bei allen Versuchen. Es konnte kein Kallikrein - oder Urineinfluß festgestellt werden, lediglich nach 3-tägiger Kallikreinapplikation erscheint der ³⁵S-Einbau bei der Kontrollgruppe erhöht.

2. Granulationsgewebe:

Allgemein wird hier wesentlich mehr Sulfat eingebaut als in die normale Haut: 50.000 - 120.000 dpm/100 mg Feuchtgewebe bzw. 400.000 - 1.400.000 dpm/100 mg Trockengewebe.

Ein meßbarer Kallikreineinfluß tritt erst mit Verzögerung ein, während nach 3- und 5-tägiger Verabreichung von je 5 KE/100 mg KG lediglich eine minimale Erhöhung der Sulfataufnahme unter Kallikreineinfluß auftritt, ist nach 7 bzw. 9 Tagen eine im 5 %-Bereich signifikante Erhöhung der Impulsraten festzustellen. Nach 15 Tagen ist weder durch Kallikrein noch durch Rattenurin eine Beeinflussung meßbar.

3. Die "Aktivität der Wunde"

gibt das Verhältnis des ³⁵S-Einbaus in das Granulationsgewebe im Vergleich zum Einbau in die unverletzte Haut wieder und ermöglicht einen Vergleich der Sulfatinkorporation an den verschiedenen Tagen der Wundheilung.

Es zeigt sich, daß in das Granulationsgewebe deutlich mehr Sulfat eingebaut wird: bezogen auf das Feuchtgewebe durchschnittlich die 2-3-fache Menge, beim Trockengewebe bis 10-mal mehr.

Bei den unbehandelten Tieren steigt die Aktivität der Wunde bis zum 7. Tag, fällt am 9. Tag etwas ab und nimmt bis zum 15. Tag wieder deutlich zu. Bei den Kallikreintieren steigt sie bis zum 7. Tag stärker als bei den Kontrolltieren an und bleibt auf diesem Niveau bis zum 15. Tag. Am 7. und am 9. Tag ist sie bei den Kallikreingruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen wesentlich höher. Der injizierte Rattenurin zeigt auch hier keinen Einfluß.

4. Gesamtgewicht des Granulationsgewebes

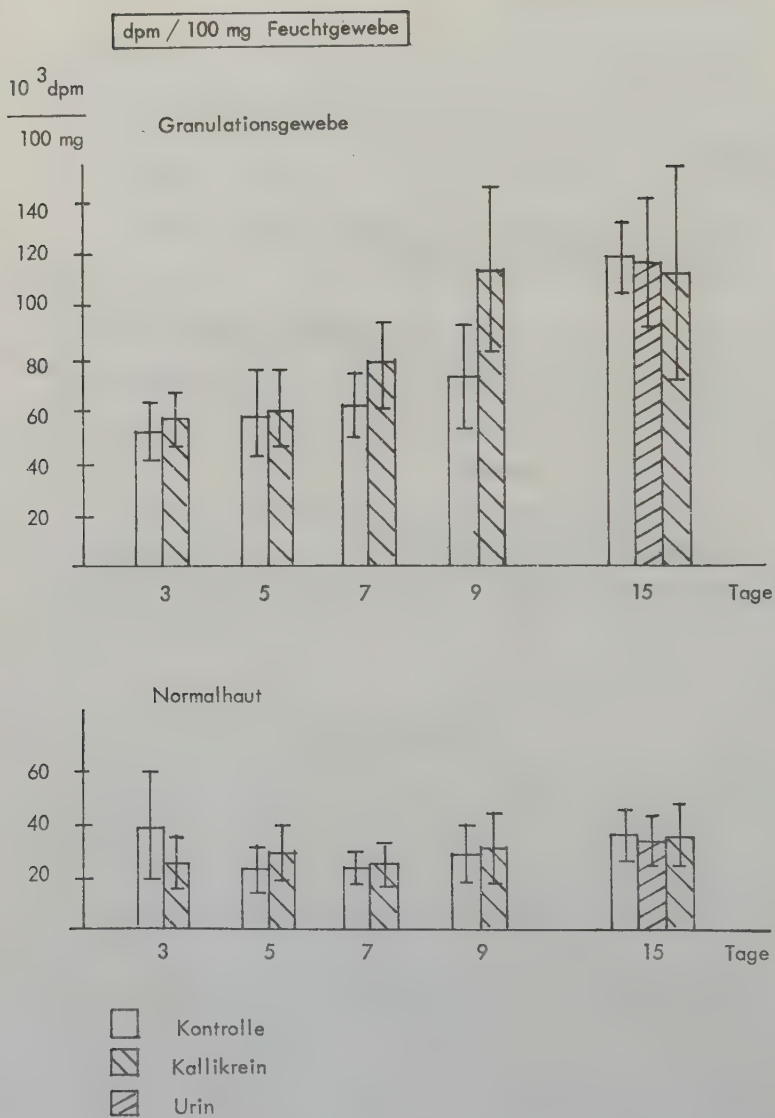
Das Gewicht des Granulationsgewebes steigt allgemein mit der Versuchsdauer an.

Nach 3 und 5 Tagen Kallikreineinfluß ist keine Wirkung feststellbar, während nach 15 Tagen eine vermehrte Granulationsgewebsproduktion durch Kallikrein und etwas geringer durch Rattenurin erkennbar wird (diese Ergebnisse sind wegen der geringen Zahl der verwerteten Gewebsstücke aber nur vorsichtig zu bewerten).

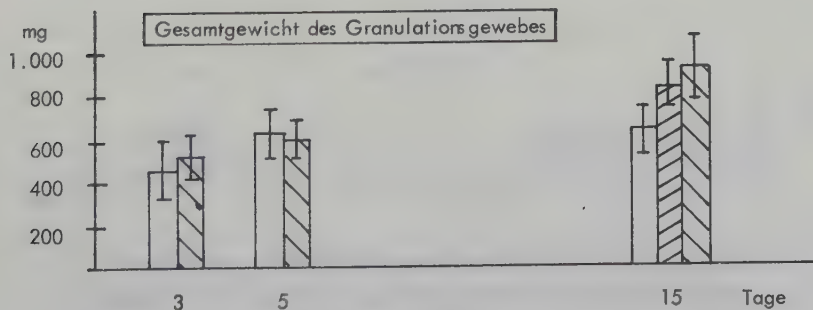
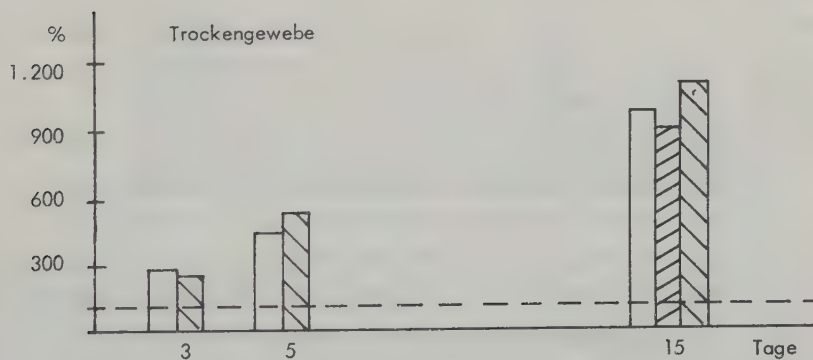
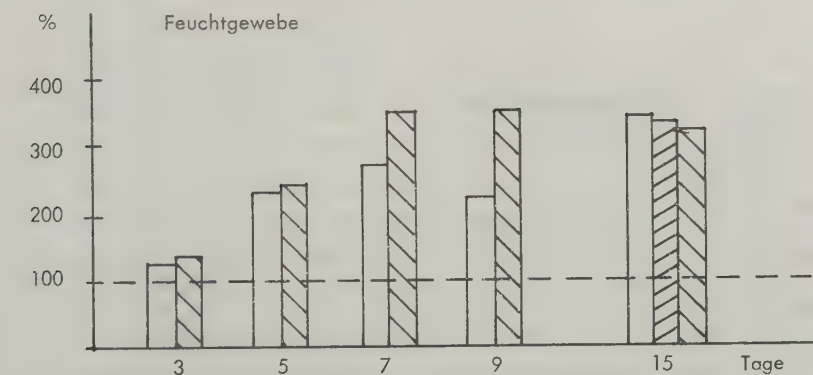
5. Allgemeine Beobachtungen

Auffallend war bei allen Versuchen, daß, sowohl bei den behandelten wie bei den unbehandelten Tieren, sehr starke Unterschiede in der Gefäßversorgung des Granulationsgewebsstückes feststellbar waren. Vor allem zu Beginn der Wundheilung (3 u. 5 Tage) wurden bei einigen Tieren kaum Gefäße gesehen, während bei anderen auffalend viele oder sehr dicke Gefäße erkennbar waren.

Die ³⁵S-Einbauraten schwankten zum Teil ebenfalls erheblich: der Variationskoeffizient beträgt meist 20 - 30 %, bei der Kallikreingruppe von Versuch 2 sogar 40 %!

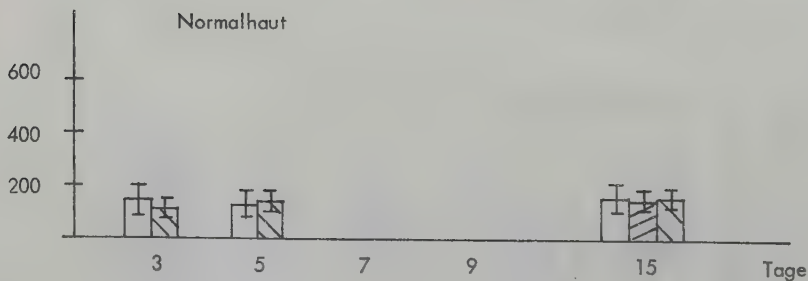


Aktivität der Wunde



-  Kallikrein
-  Kontrolle
-  Urin

dpm / 100 mg Trockengewebe



VIII. Diskussion der Ergebnisse

In den vielen Veröffentlichungen über das Kallikrein - Kininsystem wurde bisher hauptsächlich die Wirkung der Kinine auf den Kreislauf (Vasodilatation, Gefäßpermeabilitätssteigerung, Blutdruckabfall) und ihre Beteiligung beim Schock bei Pankreatitis, beim Endotoxinschock und bei Entzündungsvorgängen diskutiert.

Neuere Untersuchungen zeigen nun, daß das Kallikrein-Kinin-System auch bei der Auslösung und Regulation der Gewebsregeneration nach Wundsetzung eine Rolle spielt, und daß sich hier eventuell eine Möglichkeit der Beeinflussung der Wundheilung ergibt.

RIXON und WHITFIELD stellen an Rattentymuslymphozyten und Knochenmarkszellen unter Kallikreineinfluß eine Zunahme der DNA-Synthese und der Mitoseraten fest. ROHEN und PETER HOFF untersuchten die Wirkung von Kallikrein auf die Zellproliferation des Darmepithels und fanden nach intraperitonealer Kallikreininjektionen ein deutliches Anwachsen der Mitoseraten in den Duodenal- und Dünndarmschleimhautzellen.

Nach MANDEL und RODESCH kommt es bei Radiodermatitidem zu einer Beschleunigung der Wundheilung durch Kallikrein.

Aufgrund dieser Ergebnisse wollten wir die Wirkung von Kallikrein auf die Zellproliferation und Granulationsgewebsbildung untersuchen.

Wir erzeugten dazu reines Granulationsgewebe mit der Methode nach RUDAS und überprüften die Granulationsgewebsproduktion und ihre Beeinflussung nach folgendem Modell: Die Höhe des ³⁵S-Sulfateinbaus in das Granulationsgewebe ist ein Maß für die Chondroitinsulfatsynthese und die Grund-

substanzproduktion. Sie gibt somit Auskunft über die Granulationsgewebsbildung überhaupt und die Fibroblastenaktivität im besonderen, wenn man davon ausgeht, daß die Grundsubstanzbildung vor der Faserproduktion stattfindet und den ersten Schritt der Granulationsgewebsentstehung darstellt und daß dafür die Fibroblasten verantwortlich sind.

Die ^{35}S -Aktivität der entnommenen Gewebsstücke wurde nach entsprechender Vorbereitung mit der Flüssigkeits-Szintillations-Methode gemessen.

Die einzelnen Werte, die man nach dem Zählvorgang und anschließender Umrechnung erhält, drücken aus, wieviel Zählfälle pro Minute im Gewebe stattfinden, also wie hoch der ^{35}S -Einbau im Gewebe ist, d.h. sie geben Fibroblastenaktivität, Grundsubstanzsynthese und Granulationsgewebsbildung wieder. Dem sind allerdings durch die Methode selbst Grenzen gesetzt.

Kritik der Methode

1. Die gemessene ^{35}S -Aktivität spiegelt genau genommen nur den Einbau von Sulfat durch Transsulfatierung und die Neuproduktion von Chondroitinsulfat mit ^{35}S -Sulfat wieder und ist nur ein indirektes Maß für die Fibroblastenaktivität, Grundsubstanzsynthese und Granulationsgewebsentstehung. Die ^{35}S -Chondroitinsulfatbildung ist nur ein Teil der Grundsubstanzsynthese und der Granulationsgewebsproduktion überhaupt, sie sagt nichts über die Zusammensetzung und nur indirekt etwas über die Gesamtmenge der Granulationsgewebe aus; ein Schluß auf die Fibroblastenproliferation ist schwierig (auch wenn mehr Fibroblasten wahrscheinlich mehr Chondroitinsulfat produzieren).

2. Es wird nur der ^{35}S -Einbau während 24 Stunden, d.h. die Chondroitinsulfatsynthese in 24 Stunden gemessen und nicht Gesamtproduktion während der Versuchsdauer von 3, 5, 7, 9 bzw. 15 Tagen. Die Zerfallsraten zeigen somit nur die aktuelle Grundsubstanzsynthese am 3., 5., 7., 9. und 15. Tag und nicht die Gesamtproduktion, die aber für die Beurteilung der Granulationsgewebismenge entscheidend wäre.

3. Da wenig über die Resorption und Hemmung des intramuskulär injizierten Kallikreins gesagt werden kann, müßten verschiedene Dosierungen und Injektionsintervalle untersucht werden.

Rattenurin hat zwar den Vorteil, daß das darin enthaltene Kallikrein artspezifisch und seine Wirkung dadurch vielleicht stärker, hat aber ungereinigt zu viele andere Bestandteile, als daß man über die Wirkung von Rattenurinkallikrein etwas aussagen könnte.

Kritik der Versuchsanordnung:

1. Tierhaltung, Operation, Kallikrein- und ^{35}S -Injektion enthalten bei entsprechender Sorgfalt kaum Fehlerquellen.

2. Probenentnahme:

Messungen von ^3H -Thymidin- und ^{35}S -Inkorporationsraten und autoradiographische Befunde (80, 81) zeigen, daß die Aktivität abhängig ist von der Entfernung von der Wunde; sie ist paravulneral am größten. Die Proben müssen also immer genau von der gleichen Stelle –was wir versuchten– oder besser an mehreren Orten der Wunde (Mitte-Rand) entnommen werden.

3. Wiegen:

Die Proben wurden mit einer Analysenwaage bis auf 0,1 mg genau gewogen. Meßfehler sind aber bei aller Sorgfalt nicht ganz auszuschließen.

4. Dialyse

Sie ist unbedingt notwendig zur Eliminierung von nichteingebautem Sulfat. Schwierig ist aber die saubere Überführung der Proben aus den Dialyseschläuchen in die kleinen Meßgefäße. Die dabei möglichen Verluste sind nicht zu kontrollieren, sollten aber durch Berücksichtigung des Trockengewichts eliminiert werden.

5. Trocknung

Sie könnte bei 3 Tagen 60° Wärmeschränk evtl. unvollständig sein. Besser wäre ein Exsiccator, der aber einen erheblichen Mehraufwand mit sich bringt.

6. Die Effektivität der Zählung der einzelnen Proben wird durch die Externe-Standard-Methode berücksichtigt. Das ist ein großer Vorteil der Flüssigkeits-Szintillations-Messung.

Kritik der Ergebnisse

In diesem durch Kritik etwas eingeengten Rahmen sind die Ergebnisse zu sehen.

Wir stellten fest, daß der ^{35}S -Einbau sowohl in der Normalhaut als auch im Granulationsgewebe unabhängig von Behandlung und Versuchsdauer großen Schwankungen unterworfen ist.

Dies fand auch BESTE (82) und macht den verschiedenen Wassergehalt der Gewebstücke dafür verantwortlich. Aber auch wenn man die Aktivität auf das Trockengewebe bezieht, bleiben die großen Streubreiten.

Man muß dafür also entweder methodische Ungenauigkeiten (siehe oben) verantwortlich machen, oder aber Chondroitinsulfatsynthese, Granulationsgewebsbildung und Wundheilung als sehr komplizierte biologische Vorgänge verlaufen quantitativ sehr unterschiedlich.

Das würde durch die beobachteten großen Variationen in der Vaskularisierung des Granulationsgewebes unterstützt werden.

Wir können bestätigen, daß ^{35}S vor allem in junge und neugebildete Gewebe eingebaut wird. Bei allen Versuchen wurde in das Granulationsgewebe deutlich mehr Aktivität eingebaut als in die Normalhaut: beim Feuchtgewebe 2 - 3 mal mehr, beim Trockengewebe bis 10 mal mehr.

Kallikrein scheint auf die Fibroblastenaktivität und Grundsubstanzsynthese in der normalen, unverletzten Haut keinerlei fördernden Einfluß zu haben. 3 Tage nach Wundsetzung ist der Sulfateinbau durch Kallikrein sogar vermindert.

Das würde bestätigen, daß das Kallikrein-Kinin-System bei der Wundheilung nicht allgemein auf den Gesamtorganismus wirkt, sondern Teil eines lokalen Regulationsystems ist.

Auf die Sulfatinkorporation im Granulationsgewebe hat Kallikrein nur während einer bestimmten Zeit eine Wirkung: am 7. und am 9. Tag wird bei 7- bzw. 9-tägiger Applikation von 5 KE/100 g KG signifikant mehr ^{35}S eingebaut, während am 3. und 5. Tag nur eine Tendenz zum Mehreinbau und am 15. Tag praktisch keine Wirkung feststellbar ist.

Wie schon betont, gibt die gemessene ^{35}S -Aktivität keinen Aufschluß über die Zusammensetzung und die tatsächliche Gesamtmenge des neugebildeten Gewebes. Bestimmt man nämlich das Gewicht des Granulationsgewebsstückes im PVC-Ring, so ist dieses im Gegensatz zur ^{35}S -Inkorporationsrate nach 15 Tagen fast signifikant erhöht ($0,10 > \alpha > 0,05$). Neuere Forschungen, die die einzelnen Bestandteile des Granulationsgewebes untersuchten (83), ergaben eine sehr unterschiedliche Wirkung von Bradykinin: während der DNA-Gehalt als Maßstab für die lokale Zellproliferation signifikant zunahm und auch der Glykoproteingehalt anstieg, kam es zu einer Abnahme der Glykosaminoglykane und des Kollagens, d.h. zu einer Hemmung der Biosynthese-Aktivität der örtlichen Fibroblasten. Auch war das Kollagen qualitativ verändert.

Die Mitoserate der Fibrblasten steigt auch ohne zusätzliche Beeinflussung im Wundfeld schon gewaltig an (bis auf das 12-fache (27)). Der Kinin-gehalt im Plasma steigt ebenfalls nach Wundsetzung unabhängig von der Art der Gewebläsion mit einem Maximum am 2. und 3. Tag (84).

Das Kallikrein-Kinin-System spielt also bei der Wundheilung sicherlich eine erhebliche Rolle bei der Regulation des Wiederaufbaus von Geweben. Seine Wirkung scheint aber sehr differenziert zu sein, sowohl was Art und Intensität als auch das zeitliche Ausmaß der Beeinflussung einzelner proliferativer und reparativer Vorgänge betrifft.

Eine durch Kallikreininjektionen über das bei der Wundheilung schon vorhandene Maß hinausgehende Kininfreisetzung hat wahrscheinlich zu differenzierte Auswirkungen auf die Granulationsgewebsentstehung, als daß man sie mit der ^{35}S -Sulfatinkorporation allein eindeutig feststellen könnte.

Zur eindeutigen Klärung der Kallikreinwirkungen bei der Wundheilung und Granulationsgewebsentstehung und den Möglichkeiten ihrer Beeinflussung müßten weitere Untersuchungen folgen mit größeren Versuchsreihen, Verbesserungen der Methode, autoradiographischer Auswertung, Berücksichtigung verschiedener Kallikreinkonzentrationen und gleichzeitiger Bestimmung von DNA-Gehalt, Kollagengehalt, Gesamtgewicht und ähnlichem.

IX. Zusammenfassung

1. Versuche in jüngster Zeit haben gezeigt, daß Kallikrein neben seiner Wirkung auf den Blutkreislauf und die glatte Muskulatur einen stimulierenden Einfluß auf die DNA-Synthese, Mitoserate und Zellproliferation hat.
2. Wir untersuchten deshalb die Wirkung von Kallikrein auf die Granulationsgewebsbildung. Wir erzeugten reines Granulationsgewebe und bestimmten Fibroblastenaktivität, Grundsubstanzproduktion und Gewebsneubildung indirekt durch Messen der ^{35}S -Sulfat-Inkorporationsrate, die die Chondroitinsulfatproduktion widerspiegelt.
Die Aktivität im Gewebe wurde mit der sehr effektiven Flüssigkeits-Szintillations-Methode im TRI CARB gemessen. Dabei regt der radioaktive Schwefel in der Probe eine Fluoreszierende Lösung zur Emission von Lichtblitzen an, die von einer Photozelle registriert und anschließend analysiert und gezählt werden.
3. Das Ergebnis zeigt, daß große Streubreiten der ^{35}S -Inkorporation nicht zu vermeiden waren.
4. Rattenurin mit einer entsprechenden Kallikreinkonzentration zeigt keine Wirkung.

Intramuskuläre Injektionen von täglich 5KE/100 mg KG über 3, 5, 7, 9 und 15 Tage scheinen keinen Einfluß auf die unverletzte Haut zu haben.

Die gleiche Kallikreinmenge führt im Granulationsgewebe am 7. und 9. Tag zu einer signifikanten Mehraufnahme von ^{35}S -Sulfat, also zu einer erhöhten Fibroblastentätigkeit mit vermehrter Grundsubstanzsynthese. Am 3. und 5. Tag ist zwar eine Tendenz zum Mehreinbau von Sulfat aber kein signifikanter Einfluß von Kallikrein feststellbar. Am 15. Tag ist praktisch kein Unterschied mehr in der Sulfatinkorporation, obwohl die Gesamtmenge des Granulationsgewebes erhöht ist.

5. Die alleinige Messung der ^{35}S -Inkorporation als Maß für die Bindegewebsentstehung erscheint bei der differenzierten Wirkung von Kallikrein auf den sehr komplizierten Vorgang Wundheilung als nicht ausreichend.
6. Weitere Untersuchungen, die dem Rechnung tragen, müßten folgen.

X. Literatur

1. Frey, E.K., H. Kraut, E. Werle, R. Vogel, G. Zickgraf u.
I. Trautschold: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Enke-Verlag, Stuttgart (1968)
2. Fiedler, F.: Pig Pancreatic Kallikreins A and B.
Methods in Enzymology (im Druck)
3. Bhoola, K.D., G. Dorey, Brit. J. Pharmacol. 43 : 784 (1971)
4. Margolis, J., J. Physiol. 137 : 95 (1957),
J. Physiol. 151 : 238 (1960)
5. Austen, K.F., J. Spragg, A. Schreiber, A. Kaplan,
V th Int. Cong. Pharmacol., San Francisco July 23-28 1972 p. 182
6. Werle, E., I. Trautschold, Handbuch d. physiol. u. pathol.
Chem. Analyse. 10 Aufl. Bd. VI/C (1966)
7. Elliot, D.F., G.P. Lewis u. D.G. Smyth,
Biochem. J. 87, 21 P (1963)
8. Werle, E., I. Trautschold u. G. Lysath,
Z. Physiol. Chem. 326, 174 (1961)
9. Pierce, J. V. u. M.E. Webster: Biochem. biophys.
Res. Commun. 5, 353 (1961)
10. Trautschold, I. u. E. Werle,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 325, 48 (1961)
11. Trautschold, J., Habilitationsschrift, Med. Fak. München (1965)
12. Werle, E. u. B. Kaufmann-Bötsch:
Naturwissenschaften 46, 559 (1959)
Werle, E. u. B. Kaufmann-Bötsch:
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 52 (1960)
Habermann, E.: Nanny Schmiedebergs Arch. exp.
Pathol. Pharmacol. 236, 492 (1959)

13. Werle, E. u. M. Grunz: Biochem. Z. 301, 429 (1939)
14. Stoepele, K. u. G. Kroneberg: Arch. exper. pathol. Pharmacol. 245, 284 (1963)
15. Frey, E.K. u. H. Kraut: Arch. exper. path. Pharmacol. 133, 1 (1928)
16. Frey, E.K., E. Werle u. E. Sackers: Z. ges. exp. Med. 96, 404 (1935)
17. Werle, E. u. G. Multhaupt: Münchn. med. Wschr. 79, 407 (1937)
18. Lorenz, O.: Med. Klin. 17, 379 (1946)
19. Lindemann, A. Leitfaden d. Chirurgie u. Orthopädie der Kiefer und des Mundes, Lieferung 5, Barth Leipzig (1947)
20. Structure and Function of Biologically active peptides Bradykinin, Kallidin and Congeners, Ann. N.Y. Acad. of Sciences Vol 104 (1963)
21. Brecker, G.A., Brobmann, G.F.: Handbuch d. exper. Pharmacol. Vol. XXV, pp 351-361, Berlin-Heidelberg-New York: Springer (1970)
22. Carr, J. u. D.L. Wilhelm: Nature 208, 653 (1965)
23. Stürmer, E. in E.G. Erdös, N. Back u. F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, Springer New York (1966)
24. Stürmer, E. u. A. Cerlette: Helv. physiol. Acta 19, C 32 (1961)
25. Rixon, R.H. u. I.F. Whitfield in G.L. Haberland u. J.W. Rohen: Kininogenases: Kallikrein: 1st Symposium on Physiol. Properties and Pharmacol. Paternal. Schattauer, Stuttgart-New York (1973)
26. Lindner J., P. Huber: Med. Welt 24, 22 (1973)
27. Schallok, G, J. Lindner: Med. J. 12-20 (1971)

28. Dittrich, H.: *Der Chirurg* 42: 289-295 (1971)
29. Boström, H., K. Vernssen, N.W. Withehouse
Biochem. Pharmacol. 13: 413-421 (1964)
30. Brack, W.J., I. Lindner, A. Jasper:
Acta histochem. 13: 195-219 (1962)
31. Lindner, I.: *Habilitationschrift*, Hamburg (1957)
32. Lindner, I., K. Grasedyk: *Z klin. Chemie u.*
klin. Biochemie 9: 68 (1971)
33. Chen, R.W., Postlewait, R.W.: *Monogr. surg. Sci.* 1, 215 (1964)
34. Gutzmann, F., C. Braun u. R.K.S. Lim:
Arch. int. Pharmacodyn. 136, 353 (1962)
35. Sicuteri, F.: *Bibl. anat.* 1. 591 (1965)
36. Habermann, E.: *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.*
245, 230 (1963)
37. Fehler, P.J. u. F. Kalz: *Dermatologia* 133, 190 (1966)
38. Harpmann, I.A. u. R.T.J. Allen: *Brit. Med. J.* 1043 (1959)
39. Armstrong, D., J.B. Jepson, C.A. Keele u. J.W. Steward:
J. Physiol. 135, 350 (1957)
40. Eisen.V.: *Brit. med. Bull.* 20, 205 (1964)
41. Webster, M.E. u. I. Innerfield: *Enzymol. biol. clin.* 5, 129 (1956)
42. Whitfield, J.F., J.P. Mac Manus, P.J. Gillan:
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 133, 1270-1274 (1970)
43. Massart, A., J. Henry: *J. Belg. Radiol.* , 44, 667 (1961)
44. Massart, A., J. Rodesch: *Rapp. EUR* 125 F, (1962)
45. Mandel, P., J. Rodesch, J.M Mautz:
Kininogenases, Kallikrein, First Symposium on
Physiol. Properties and Pharmacol. Rational, Intern.
Symposium held at the Academy of Science and Literature at Mainz,
Nov. 18. and 19. 1972, ed. by G.L. Haberland and J.W. Rothen,
Schattauer, Stuttgart-New York (1973)

46. Selye, H.: Einf. in die Lehre vom Adapt. syndrom
Stuttgart (1953)
47. Meier, R., W. Schüler, P. Desulles: *Experimenta*, 6, 469 (1950)
48. Müller, J.W., Sayers, R.R., Yant, W.P.:
J. am. Med. Ass. 103, 907 (1934)
49. Tünnerhoff, E.K., K. Schwabe:
Arzneim. Forsch. 8, 773 (1958)
50. Taubenhaus, M., G.D. Amromin:
J. Lab. a. Clin. Med. 36, 7-18 (1950)
51. Selye, H., G. Hauser: Fourth Annual Report on Stress,
Acta In. Publ., Montréal (1952)
Zit. in Stern, Nikulin: *Arzneim. Forsch.* 11, 495 (1957)
52. Heubner, W., P. Grabe:
Arch. exp. Path. u. Pharm. 171, 329 (1933)
53. Sely, H.: *Endokrinologie* 21, 169 (1937)
54. Massart, A., J. Henry: *J. Belg. Radiol.*, 44, 667 (1961)
55. Massart, A., J. Rodesch: *Rapp. EUR* 125 F (1962)
56. Arturson, G.: *Acta path. et microbiol. scandinav.* 61, 353-364 (1964)
57. Schild, B., A. Nilsson: *European Surgical Research*,
2, 23-33 (1970)
58. Rudas, B., *Arzneimittelforschung* 10, 226-229 (1960)
59. Dziewiatkowski, D.D.: *J. biol. Chem.* 178, 197-202 (1949)
60. Boström, H., U. Fridberg, E. Odeblad, N. Ringertz
Acta pathol. microbiol. scand. 35, 1-7 (1954)
61. Fridberg, U., N.R. Ringertz: *Experimenta* 10, 67-68 (1954)
62. Layton, L.L.: *Cancer*, 4, 198-201 (1951)
63. Campari et al : *Experimenta* 16, 423-424 (1960)
64. Boström, H., B. Mansson: *Acta chem. scand.* 6, 1559, 1561 (1952)
65. Layton, L.L.: *Proc. Soc. exp. Biol.* 76, 596-598 (1951)

66. Boström, H., S. Aquist: *Acta chem. scand.* 6, 1557-1559 (1952)
67. Boström, H., E. Odeblad, U. Fridberg: *Arch. Biochem.* 38
283-286 (1952)
68. Kennedy et al.: *Zit. in Beste, Inaug. Diss.* S. 18 Hamburg 1965
69. Meyer, K. in G. Asboe-Hansen: *Conn.t. in health and disease*
p. 31-53, Copenhagen, E. Munksgaard (1954)
70. Gradedyck, K.: *Inaug. Diss.*, Hamburg 1965
71. Dzierwiatkowski, D.D., R.E. Benesch, R. Benesch:
J. biol. Chem. 178, 931 - 938 (1949)
72. Boström, H.: *J. biol. Chem.* 196, 477-481 (1953)
73. Boström, H., S. Gardell/: *Acta chem. scand.* 7, 216-222 (1953)
74. Hauss et al: *Z. Altersforschung* 14, 259-270 (1960)
75. Nuclear Chicago: *Preparation of Samples for*
Liquid Scintillation Counting
76. ICN Tracerlab: *FLüssigkeitsszintillationstechniken*
77. Trautschold, I., E. Werle:
Hoppe-Seylers Zschr. f. physiol. Chem. S. 48 (1961)
78. Fritz H., I. Eckert, E. Werle:
Hoppe-Seylers Zschr. f. physiol. Chem.
Bd. 348, 1120-1132 (1967)
79. Mandel, P., J. Rodesch, I.M. Mautz in (45)
80. Lindner, I., G. Freytag, Z. Jurnhowa, G. Beste
G. Gries: *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50, 286-293 (1966)
81. Lindner, I., K. Grasedyk, G. Johannes
Verh. Dtsch. Ges. Path. 52, 533-541 (1968)
82. Beste: *Inaug. Diss.* Hamburg 1965)
83. Bazin, S. , M. Pelletier, A. Dalamay:
Agents and Actions Vol. 3/5, Birkenhäuser Verlag Basel (1973)
84. Zach, H.P, E. Werle: *Naumy-Schmiedebergs Arch.Pharm.*
276, 167-180 (1973)

Für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes
danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. E. Werle.

Für die freundliche Übernahme des Themas danke ich
Herrn Prof. Dr. H. Fritz.

Für wissenschaftliche Beratung bei der Durchführung der
Experimente und viele Anregungen danke ich
Herrn Dr. med. Engler.

Diese Arbeit wurde gefördert mit den Mitteln der
E.G.K.S. (Europäische Gemeinschaft für Kohle und
Stahl).

Für die freundliche Unterstützung und Beratung bei den
Messungen danke ich Herrn Dr. Lenk und
Herrn Dr. Taeger.

Lebenslauf :

Nikolaus Demmel, geboren am 1.12.1949 in Bad Tölz
als erstes von drei Kindern des Landwirts Nikolaus Demmel
und seiner Ehefrau Margarethe Demmel, geb. Granich.

Im September 1956 Eintritt in die Volksschule Bad Tölz.

Im September 1960 Aufnahme am Gymnasium Bad Tölz,
Entlassung mit Hochschulreife am 22.6.1970.

Seit dem WS 1970/71 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Am 14.10.1971 naturwissenschaftliche Vorprüfung bestanden.

Am 5.4.1973 ärztliche Vorprüfung bestanden.

Am 14.12.1977 ärztliche Prüfung bestanden.

